

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Medicina I



**ACTIVIDAD DE $\text{TNF}\alpha$ Y $\text{TGF}\beta 1$ EN LA HEPATITIS
CRÓNICA C: CORRELACIONES BIOQUÍMICAS E
HISTOLÓGICAS.**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Sonia Izquierdo Rubio

Bajo la dirección de los doctores

José María Ladero Quesada
Manuel Díaz-Rubio García

Madrid, 2010

- ISBN: 978-84-693-1272-8

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Medicina



**ACTIVIDAD $\text{TNF}\alpha$ Y $\text{TGF}\beta_1$ EN LA HEPATITIS CRÓNICA C:
CORRELACIONES BIOQUÍMICAS E HISTOLÓGICAS**

TESIS DOCTORAL

SONIA IZQUIERDO RUBIO

Madrid, 2009

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Medicina



**ACTIVIDAD $\text{TNF}\alpha$ Y $\text{TGF}\beta_1$ EN LA HEPATITIS CRÓNICA C:
CORRELACIONES BIOQUÍMICAS E HISTOLÓGICAS**

TESIS DOCTORAL

Memoria presentada para optar al Grado de Doctor por

Sonia Izquierdo Rubio

Directores de Tesis

Prof. D. José María Ladero Quesada

Prof. D. Manuel Díaz-Rubio García

Madrid, 2009

A mi familia, por sus enseñanzas y apoyo
ya que sin ellos no habría conseguido
ser lo que soy hoy.

A Alfonso, por su insistencia y
por el tiempo que no le he dedicado.

AGRADECIMIENTOS

A los Profs. Manuel Díaz-Rubio y José María Ladero, directores de esta tesis, por su ayuda, apoyo y dedicación sin los cuales no hubiera podido realizar este trabajo y por la confianza que depositaron en mí al encomendarme se realización.

A los miembros del laboratorio del Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina de la UCM por haberme acogido como un miembro más, por su tiempo y la ayuda prestada porque sin ella este trabajo no hubiera podido llevarse a cabo.

Al Dr. Luis Ortega, del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico San Carlos, que realizó el estudio histológico.

A todo el personal – médicos, enfermeras y auxiliares- del Servicio de Aparato Digestivo del Hospital Clínico San Carlos, donde me he formado como especialista.

ÍNDICE GENERAL

ABREVIATURAS	V
ÍNDICE DE TABLAS	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS	IX
INTRODUCCIÓN	1
1. Virología	3
1.1 Estructura genómica del virus C (VHC)	3
1.1.1 Regiones no codificantes	6
1.1.2 Proteínas estructurales	6
1.1.3 Proteínas no estructurales	9
1.2 Variabilidad genética del VHC	10
1.2.1 Implicaciones de la variabilidad genética del VHC	12
2. Epidemiología del virus C	15
2.1 Mecanismos de transmisión del VHC	17
2.1.1 Transición percutánea	17
2.1.2 Transición no percutánea	19
2.1.3 Infección esporádica por VHC	20
3. Patogenia	20
3.1 Mecanismos implicados en la persistencia de la infección por VHC	21
3.2 Heterogeneidad del VHC	22
3.3 Mecanismos implicados en las lesiones hepáticas	22
4. Clínica e historia natural de la enfermedad	23
4.1 Hepatitis aguda	23
4.2 Hepatitis crónica	28
4.3 Manifestaciones extrahepáticas de la infección por el VHC	30
5. Diagnóstico de la infección por el VHC	32
5.1 Técnicas serológicas	32
5.2 Técnicas virológicas o moleculares	34
5.2.1 Ensayos cualitativos	34
5.2.2 Ensayos cuantitativos	35
5.2.3 Determinación del genotipo del virus de la hepatitis C	36
6. Anatomía patológica	38

7. Tratamiento de la hepatitis crónica C	40
7.1 Tipos de respuesta	41
7.2 Fármacos disponibles	42
7.3 Protocolo terapéutico actual	44
7.4 Factores que influyen en la respuesta al tratamiento	46
7.5 Adherencia al tratamiento	47
7.6 Contraindicaciones y efectos adversos del tratamiento	48
8. Células del sistema inmune	49
8.1 Linfocitos	49
8.2 Células presentadoras de antígenos (CPA)	54
8.3 Células citotóxicas naturales (NK)	56
9. Respuesta inmune frente a virus	56
9.1 Respuesta inmune innata	56
9.2 Respuesta inmune específica	58
10. Citocinas	62
10.1 Concepto y nomenclatura	62
10.2 Clasificación	63
10.2.1 Citocinas que median la inmunidad innata	63
10.2.2 Citocinas que regulan la inmunidad adquirida	65
10.2.3 Citocinas con actividad antiinflamatoria e inmunosupresora	66
10.3 Receptores de citocinas	67
10.4 Dificultades para evaluar la respuesta inmune específica	68
11. Respuesta inmune y VHC	68
11.1 Interacción VHC-hepatocito	69
11.2 Respuesta inmune humoral	69
11.3 Respuesta inmune celular	70
12. Citocinas en la hepatitis crónica C	73
13. Factor de necrosis tumoral (TNF)	74
13.1 Introducción	74
13.2 Células productoras	75
13.3 Genética y proteómica	76
13.4 Receptores de TNF	76
13.5 Vías de señal a través de TNFR1 y TNFR2	77
13.6 Funciones del TNF	80
13.7 Papel del TNF α en la enfermedad hepática	81

14. Factor de transformación de crecimiento β_1 (TGF β_1)	82
14.1 TGF β_1 y hepatitis crónica C	83
ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	85
HIPÓTESIS	89
OBJETIVOS	91
PACIENTES Y MÉTODOS	93
1. Pacientes	94
2. Métodos	95
2.1 Análisis histológico	95
2.2 Análisis virológico	96
2.3 Análisis sérico del receptor tipo 2 del TNF α (sTNFR-2)	97
2.4 Análisis sérico del TGF β_1	98
2.5 Análisis del TGF β_1 a nivel hepático	98
2.6 Métodos estadísticos	99
RESULTADOS	101
1. Datos demográficos y virológicos	102
2. Niveles de TNFR2 en suero	103
2.1 Comparación entre casos y controles	103
2.2 Análisis de los niveles de sTNFR-2 frente a parámetros bioquímicos	103
2.3 Análisis de los niveles de sTNFR-2 frente a parámetros histológicos	105
2.3.1 Análisis de los niveles de sTNFR-2 según el grado de actividad necroinflamatoria	105
2.3.2 Análisis de los niveles de sTNFR-2 según el estadio de fibrosis	107
2.4 Niveles de sTNFR-2 en los pacientes que recibieron tratamiento según el grado de respuesta	109
3. Análisis de los niveles séricos de TGF β_1	111
3.1 Comparación entre casos y controles	111
3.2 Análisis de los niveles de TGF β_1 sérico frente a parámetros bioquímicos	111
3.3 Análisis de los niveles de TGF β_1 sérico frente a parámetros histológicos	112
3.3.1 Análisis de los niveles de TGF β_1 sérico según el grado de actividad necroinflamatoria	113
3.3.2 Análisis de los niveles de TGF β_1 sérico según el estadio de fibrosis	114
3.4 Niveles séricos de TGF β_1 en los pacientes que recibieron tratamiento según el grado de respuesta	116

4. Análisis de los niveles tisulares de $TGF\beta_1$	118
4.1 Análisis niveles tisulares de $TGF\beta_1$ frente a parámetros bioquímicos	119
4.2 Análisis $TGF\beta_1$ tisular frente a parámetros histológicos	121
4.2.1 Análisis de los niveles de $TGF\beta_1$ tisular según el grado de actividad necroinflamatoria	121
4.2.2 Análisis de los niveles de $TGF\beta_1$ tisular según el estadio de fibrosis	122
4.3 Niveles tisulares de $TGF\beta_1$ en los pacientes que recibieron tratamiento según el grado de respuesta	124
5. Otras correlaciones	126
5.1 Correlación entre las transaminasas y el grado de actividad histológica	126
5.2 Correlación entre los niveles séricos y tisulares de $TGF\beta_1$	129
DISCUSIÓN	130
1. Significado de los niveles plasmáticos del TNFR-2	131
2. Significado de los niveles séricos de $TGF\beta_1$	133
3. Significado de los niveles hepáticos de $TGF\beta_1$	134
CONCLUSIONES	136
BIBLIOGRAFÍA	138

Abreviaturas

μg: microgramos

ADNc: ácido desoxirribonucleico complementario

ALT: alanino amino transferasa

ARN: ácido ribonucleico

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

AST: aspartato amino transferasa

BR: bilirrubina

C: proteína del core

Células LAK: células asesinas activadas por linfocinas

Células Th: células T helper o cooperadoras

CHC: carcinoma hepatocelular

CM: crioglobulinemia mixta

CME: crioglobulinemia mixta esencial

CPA: células presentadoras de antígenos

DD: dominio death

E: proteína de la envoltura

ELAM: endotelial leukocyte adhesión molecule o molécula leucocitaria de adhesión endotelial

FA: fosfatasa alcalina

GGT: gamma glutamil transferasa

GM-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos/macrofagos

GNMP: glomerulonefritis membranoproliferativa

gp: glicoproteína

HAI: índice de actividad histológica

HLA: human leukocyte antigens o antígenos leucocitarios humanos

HVR: región hipervariable

ICAM: intercellular adhesion molecule o molécula de adhesión intercelular

IFN: interferón

Ig: inmunoglobulina

IL: interleucina

IN: inmunidad natural o innata

IRES: internal ribosome entry site

ISDR: región determinante de la sensibilidad al interferón

LAP: péptido asociado a latencia

LB: linfocito B

LDLR: receptor de lipoproteínas de baja densidad
Log: logaritmo
LT: linfotoxina
LTC: linfocitos T citotóxicos
MAPK: mitogen-activated protein kinases o protein-cinasas activadas por mitógenos
MHC: major histocompatibility complex o complejo mayor de histocompatibilidad
MMPs: metaloproteinasas
NCR: non-coding region
NF- κ B: factor nuclear kappa B
NIK: cinasa inductora del factor nuclear kappa B
NK: natural killer
NS: proteína no estructural
OMS: organización mundial de la salud
ORF: open reading frame
p: proteína
PCR: reacción en cadena de polimerasa
Peg-IFN: interferón pegilado
PKA: protein-cinasa A
PKR: protein-cinasa R
PTB: proteína fijadora de tractos de polipirimidina
RBV: ribavirina
RCT: receptor de linfocitos T
RIBA: inmunotransferencia con antígenos recombinantes
RIP: proteína de interacción con el receptor
RT-PCR: reacción en cadena de polimerasa con transcriptasa inversa
RVP: respuesta virológica precoz
RVS: respuesta virológica sostenida
SNC: sistema nervioso central
SODD: silenciador de dominio death
sTNFR: receptor sérico del factor de necrosis tumoral
TGF: factor de transformación de crecimiento
Th: linfocito T helper
Th0: célula precursora
TIMPs: inhibidores de proteasas
TMA: transcripción mediada por amplificación
TNF: factor de necrosis tumoral

TNFR: receptor del factor de necrosis tumoral
TRADD: receptor del factor de necrosis tumoral asociado a dominio death
TRAF2: receptor del factor de necrosis tumoral asociado a factor 2
UDVP: usuarios de drogas por vía parenteral
UTR: untranslated region o región no codificada
VCAM: vascular cell adhesion molecule o molécula de adhesión vascular
VHA: virus hepatitis A
VHB: virus hepatitis B
VHC: virus hepatitis C
VIH: virus de inmunodeficiencia humana
VSG: velocidad de sedimentación globular

Índice de tablas

Tabla 1: Importancia del patrón de transmisión en el riesgo de infección	17
Tabla 2: Factores que influyen en la progresión de la hepatitis crónica C	28
Tabla 3: Factores que favorecen la progresión hacia la fibrosis hepática	29
Tabla 4: Manifestaciones extrahepáticas en la infección crónica por VHC	31
Tabla 5: Métodos moleculares disponibles para el diagnóstico	37
Tabla 6: Objetivos de la biopsia hepática en la hepatitis crónica C	39
Tabla 7: Índice de actividad histológica (Histology Activity Index) o índice de Knodell	40
Tabla 8: Factores que influyen en la respuesta al tratamiento	47
Tabla 9: Contraindicaciones del tratamiento con interferón pegilado y ribavirina	48
Tabla 10: Datos demográficos y virológicos	102
Tabla 11: Niveles de sTNFR-2 en sujetos con hepatitis crónica C y controles	103
Tabla 12: Correlaciones entre los parámetros bioquímicos y el sTNFR-2	104
Tabla 13: Niveles de sTNFR-2 según el grado de actividad necroinflamatoria	106
Tabla 14: Niveles de sTNFR-2 según el estadio de fibrosis hepática	107
Tabla 15: Niveles de sTNFR-2 según el grado de respuesta al tratamiento	110
Tabla 16: Niveles séricos de $\text{TGF}\beta_1$ en sujetos con hepatitis crónica C y controles	111
Tabla 17: Correlaciones entre los parámetros bioquímicos y el $\text{TGF}\beta_1$ sérico	112
Tabla 18: Niveles séricos de $\text{TGF}\beta_1$ según el grado de actividad necroinflamatoria	113
Tabla 19: Niveles séricos de $\text{TGF}\beta_1$ según el estadio de fibrosis hepática	114
Tabla 20: Niveles séricos de $\text{TGF}\beta_1$ según el grado de respuesta al tratamiento	117
Tabla 21: Correlaciones entre los parámetros bioquímicos y el $\text{TGF}\beta_1$ tisular	119
Tabla 22: Niveles tisulares de $\text{TGF}\beta_1$ según el grado de actividad necroinflamatoria	121
Tabla 23: Niveles tisulares de $\text{TGF}\beta_1$ según el estadio de fibrosis hepática	122
Tabla 24: Niveles tisulares de $\text{TGF}\beta_1$ según el grado de respuesta al tratamiento	125

Índice de figuras

Figura 1: Estructura del VHC	4
Figura 2: Representación esquemática de la lipoproteína del VHC	5
Figura 3: Proteínas codificadas por el genoma del VHC	5
Figura 4: Prevalencia estimada de la infección por el VHC (datos de la OMS)	16
Figura 5: Curso hacia la cronicidad de la hepatitis aguda por VHC	26
Figura 6: Evolución clínica de la infección por el VHC	27
Figura 7: Historia natural de la hepatitis crónica C	30
Figura 8: Frecuencia de respuesta virológica sostenida tras tratamiento con interferón pegilado y ribavirina según el genotipo (tres estudios)	44
Figura 9: Diferenciación a linfocitos Th1 y Th2	52
Figura 10: Citocinas y mecanismos efectores inmunidad innata	58
Figura 11: Mecanismos de la respuesta inmune innata y adaptativa (humoral y celular). Respuestas citocínicas tipo 1 y tipo 2	61
Figura 12: Cadena apoptosis	79
Figura 13: Correlación de sTNFR-2 con las transaminasas (AST, ALT)	104
Figura 14: Correlación entre la cifra de plaquetas y el sTNFR-2	105
Figura 15: Niveles de sTNFR-2 según el grado de actividad necroinflamatoria	106
Figura 16: Niveles de sTNFR-2 según el estadio de fibrosis	107
Figura 17: Niveles de sTNFR-2 según el estadio de fibrosis (F0 y F1 vs. F3 y F4)	108
Figura 18: Niveles de sTNFR-2 según el estadio de fibrosis (F0, F1 y F3 vs. F4)	109
Figura 19: Niveles de sTNFR-2 entre los que recibieron tratamiento y los que no	110
Figura 20: Niveles de sTNFR-2 entre los que respondieron al tratamiento y los que no	110
Figura 21: Niveles séricos de TGF β ₁ según el grado de actividad necroinflamatoria	113
Figura 22: Niveles séricos de TGF β ₁ según el estadio de fibrosis	114

Figura 23: Niveles séricos de $\text{TGF}\beta_1$ según el estadio de fibrosis	
(F0 y F1 vs. F3 y F4)	115
Figura 24: Niveles séricos de $\text{TGF}\beta_1$ según el estadio de fibrosis	
(F0, F1 y F3 vs. F4)	116
Figura 25: Niveles séricos de $\text{TGF}\beta_1$ entre los que recibieron tratamiento	
y los que no	117
Figura 26: Niveles séricos de $\text{TGF}\beta_1$ entre los que respondieron al tratamiento	
y los que no	118
Figura 27: Correlación entre los niveles tisulares de $\text{TGF}\beta_1$ y las	
transaminasas (AST, ALT)	120
Figura 28: Correlación entre la cifra de plaquetas con los niveles séricos	
y tisulares de $\text{TGF}\beta_1$	120
Figura 29: Niveles tisulares de $\text{TGF}\beta_1$ según el grado de actividad	
necroinflamatoria	122
Figura 30: Niveles tisulares de $\text{TGF}\beta_1$ según el estadio de fibrosis	123
Figura 31: Niveles tisulares de $\text{TGF}\beta_1$ según el estadio de fibrosis	
(F0 y F1 vs. F3 y F4)	123
Figura 32: Niveles tisulares de $\text{TGF}\beta_1$ según el estadio de fibrosis	
(F0, F1 y F3 vs. F4)	124
Figura 33: Niveles tisulares de $\text{TGF}\beta_1$ entre los que recibieron tratamiento	
y los que no	125
Figura 34: Niveles tisulares de $\text{TGF}\beta_1$ entre los que respondieron al tratamiento	
y los que no	126
Figura 35: Correlación entre los niveles séricos de AST y el grado de actividad	
necroinflamatoria	127

Figura 36: Correlación entre los niveles séricos de ALT y el grado de actividad necroinflamatoria	127
Figura 37: Niveles séricos de AST según el estadio de fibrosis	128
Figura 38: Niveles séricos de ALT según el estadio de fibrosis	128

Durante muchos años, el virus de la hepatitis A y el virus de la hepatitis B se consideraron como los principales agentes causantes de hepatitis, incluso en casos de hepatitis postransfusional. Tras establecer métodos de prevención y diagnóstico de los mismos y ante la persistencia de los casos de hepatitis postransfusional, se pensó en la existencia de otro agente causal de hepatitis que se denominó provisionalmente virus de la hepatitis no-A y no-B.

El enigma se resolvió con la identificación del virus de la hepatitis C (VHC), un virus fundamentalmente hepatotropo aunque puede infectar otras células como son los monocitos, linfocitos y células secretoras (Shimizu YK y cols. 1996, Wong DK y cols. 2001, Caussin-Schwemling C y cols. 2001, Arrieta JJ y cols. 2001).

En 1989, y tras múltiples ensayos, Choo y cols. aislaron parte del genoma del VHC mediante estudio de ADNc extraído del plasma de un chimpancé infectado crónicamente por el VHC; el genoma del virus estaba constituido por una molécula de ARN de cadena simple de unas 10 kilobases (Choo QL y cols. 1989). Posteriormente, en el mismo año, Kuo y cols. identificaron mediante la técnica de ELISA la presencia de anticuerpos anti-VHC, útiles en el diagnóstico de la infección por el virus C (Kuo G y cols. 1989).

Aunque el descubrimiento del genoma del VHC ha facilitado el conocimiento de la historia natural de la enfermedad, así como de la inmunología y la epidemiología de la infección por VHC, la morfología del virus no quedó caracterizada definitivamente hasta el año 1994.

Taxonómicamente, el VHC se encuadra dentro de la familia de los Flavivirus, género Hepacivirus.

Es un virus de replicación preferencial en el citoplasma de los hepatocitos pero no es directamente citopático y tiene gran variabilidad genómica (genotipos, subtipos y cuasiespecies).

1. Virología

1.1 Estructura genómica del VHC

El virus de la hepatitis C es un virus ARN lineal, de polaridad positiva, con un genoma de unas 9,6 kilobases, aunque su longitud varía un poco entre los distintos genotipos. Posee una única estructura de lectura que ocupa casi todo el genoma (ORF, *open reading frame*) que codifica una poliproteína precursora de unos 3010 a 3033 aminoácidos aproximadamente (Major M y Feinstone SM. 1997), flanqueado por dos regiones no traducidas y altamente conservadas, denominadas 5' y 3' UTR (untranslated region). El genoma actúa como un ARN mensajero de un precursor poliproteico a partir del cual se liberan las distintas proteínas virales (estructurales y no estructurales) por la acción combinada de proteasas celulares y virales. Las partículas virales tienen un tamaño que oscila entre 50-70 nm de diámetro, son de forma icosaédrica y están provistas de una cápside proteica (core) que, a su vez, está cubierta por dos proteínas de envoltura (E1 y E2) (Li X y cols. 1995).

Como ya se ha mencionado las proteasas celulares y virales fragmentan esta poliproteína precursora dando lugar a 10 proteínas virales, estructurales (nucleocápside (C, *p21*) y de la envoltura (E1, *gp31*) y (E2, *gp70*) y no estructurales (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B), organizadas de la siguiente forma: NH₂-C-E1-E2-p7-NS2-NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B-COOH (**figura 1, figura 2**) (Rosenberg S. 2001).

Las proteínas estructurales, proteínas de la nucleocápside (C) y de la envoltura viral (E1 y E2), se localizan en la zona amino terminal (N-terminal) del precursor proteico y se originan tras acción de proteasas de señal del retículo endoplásmico (RE); estas proteínas, después de su maduración en el retículo endoplásmico, sirven como componentes de los nuevos viriones. Las proteínas no estructurales no forman parte de las partículas virales, se definen por las siglas NS y un número que va del 2 al 5 (NS2-NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B) y requieren para su procesamiento de 2 proteasas virales (NS2-NS3 y NS3

proteasas). La proteína NS2 junto con la región amino terminal de la proteína NS3 constituye la proteasa NS2-NS3, que es una enzima zinc-dependiente e interviene en la separación entre NS2 y NS3. Una vez liberada de NS2, la región N-terminal de la proteína NS3 codifica una serin-proteasa viral, importante para la fragmentación postraducciona de los péptidos virales (Grakoui A y cols. 1993). La región carboxi terminal (C-terminal) de la proteína NS3 constituye una ARN helicasa esencial para desenrollar el ARN viral durante la replicación (Kim JL y cols. 1998). Existe una pequeña proteína denominada p7 originada por la división de la proteína E2, aunque no está claro que sea un componente de las partículas virales (Kato N. 2001) (**figura 3**).

Figura 1: Estructura del VHC

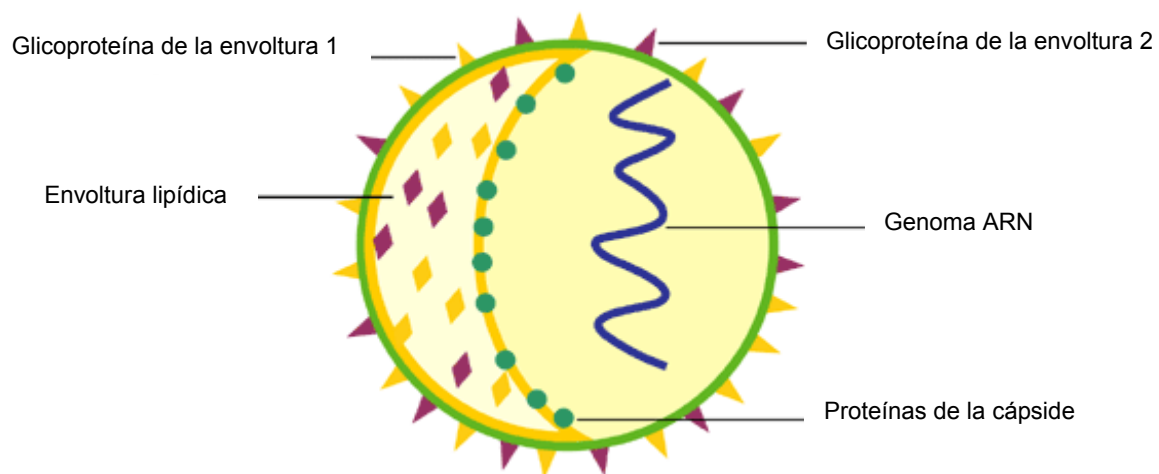
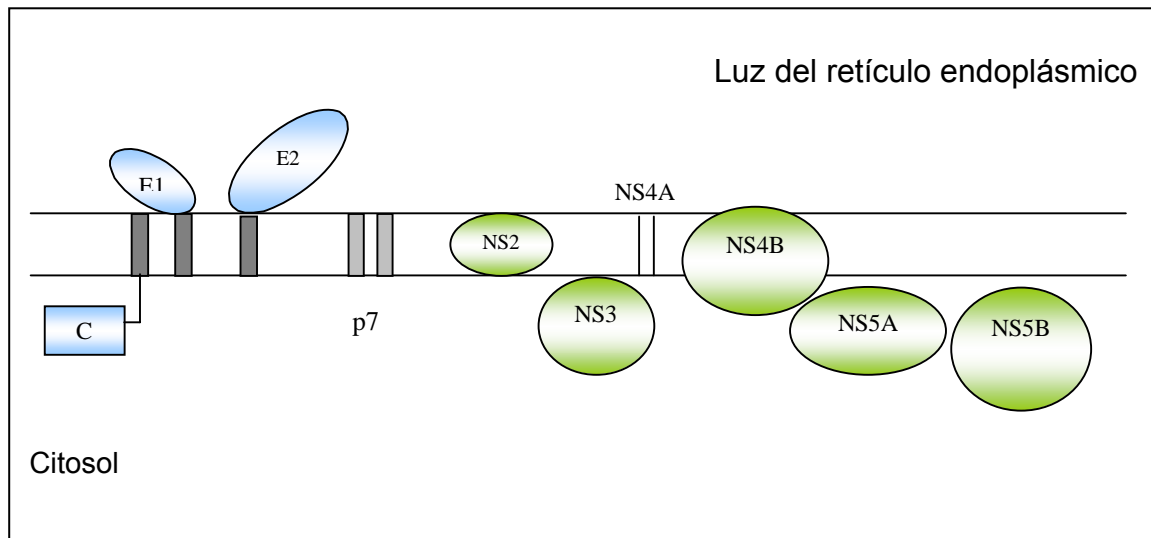
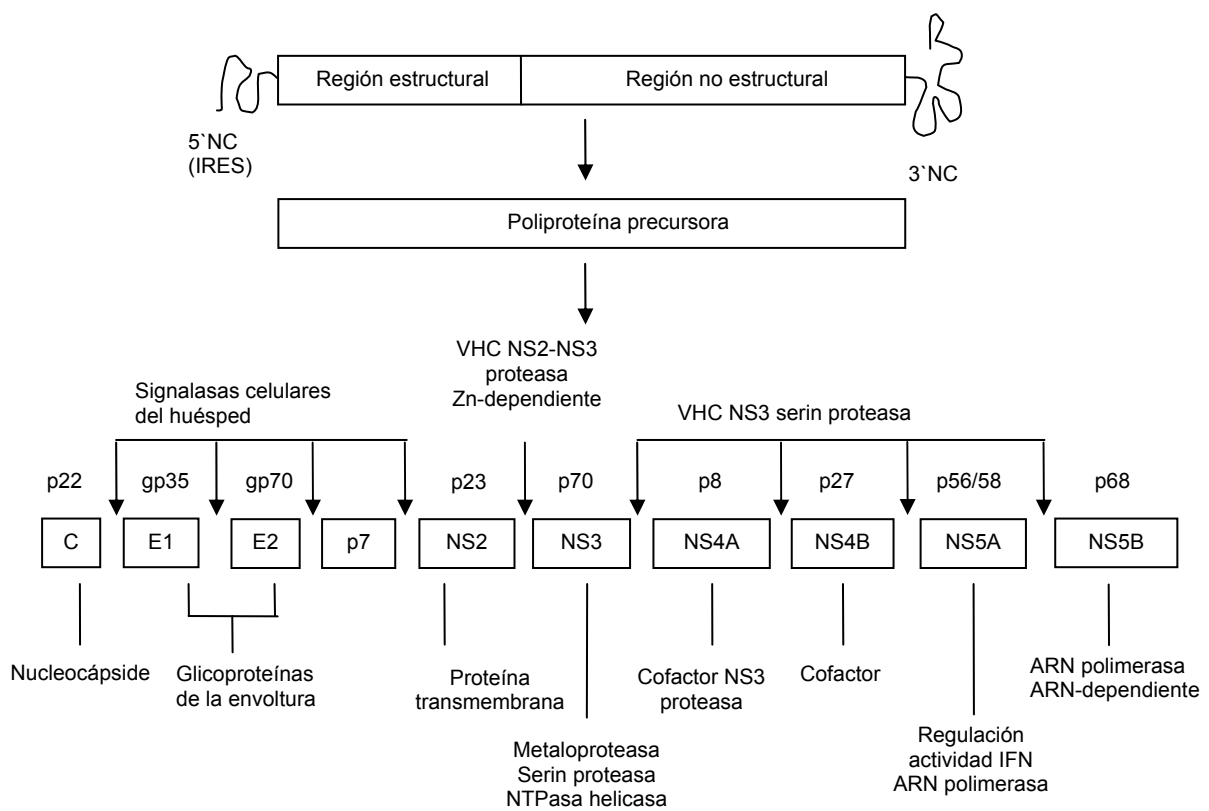


Figura 2: Representación esquemática de la lipoproteína del VHC**Figura 3: Proteínas codificadas por el genoma del VHC**

1.1.1 Regiones no codificantes

Extremo 5'UTR: También conocida como 5'-NCR (*non-coding region*), adopta forma de horquilla y es la mejor conservada del genoma del VHC, con analogías superiores al 98% entre las distintas variantes del virus. Está formada por 341 nucleótidos y juega un papel importante en la traducción, replicación y ensamblaje del genoma, por tanto, supone una diana para los métodos diagnósticos y de ampliación génica de la infección por el VHC. Incluye el sitio de iniciación de traducción de la proteína viral, así como una región interna denominada IRES (*internal ribosome entry site*), cuya principal función es permitir la unión del ribosoma de la célula huésped al ARN vírico esencial para la síntesis de proteínas virales y es probable que también lo sea para la replicación viral (Kato N. 2001, Major M y Feinstone SM. 1997, Honda M y cols. 1999).

Extremo 3'UTR: Consta de dos regiones bien definidas, separadas por una secuencia rica en poli-UC, secuencia rica en uracilos (poli U) con citosinas intercaladas, de tamaño variable. La primera está formada por unos 416 nucleótidos y la segunda por 98 nucleótidos. Esta última está muy conservada (98%-100% de homología) y es fundamental para la iniciación de la replicación de la cadena de polaridad negativa y translación de ésta. Además la región 3'UTR interviene en la replicación del VHC así como en la unión con ciertas proteínas celulares (PTB: Proteína fijadora de tractos de polipirimidina) que parecen indispensables para la replicación viral (Carric RJ y cols. 1992, Umlauf F y cols. 1996, Selby MJ y cols. 1994, Kolykhalov AA y cols. 1996, Kolykhalov AA y cols. 2000).

1.1.2 Proteínas estructurales

- Proteína de la cápside o core (C)

La proteína del core se origina de la región amino terminal (N-terminal) del precursor proteico por la acción de las peptidasas de señal de la célula huésped. Codifica las proteínas de la cápside o core. El antígeno del core es una proteína de 22kD (p22) y 173 aminoácidos de longitud. Juega un papel importante en la regulación del crecimiento de las

células infectadas por VHC, en la apoptosis y en lo relativo al estrés oxidativo, inmunomodulación, carcinogénesis y metabolismo lipídico (Kato N. 2001, McLauchlan J. 2000, Lai MM. 2002).

Se ha comprobado que la proteína del core es capaz de inhibir la apoptosis mediada por Fas- y el factor de necrosis tumoral alfa ($TNF\alpha$) a través de la activación de la vía del factor nuclear kappa B ($NF-\kappa B$) (Marusawa H y cols. 1999), y además interactúa con el receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR) (Zhu N y cols. 1998) y el receptor de la linfotoxina β (Matsumoto M y cols. 1997). También interacciona con la proteína LZIP, p53, hnRNP K, la ARN helicasa DEAD box DDX3 proteína, la proteína 14-3-3, la proteína supresora del retinoblastoma, los receptores del complemento (C1qR) y la proteína p21/Waf (Tellinghuisen TL y Rice CM. 2002, Kittlesen DJ y cols. 2000). Entre sus actividades intracelulares se encuentran la generación de radicales libres, la estimulación de las MAPK (mitogen-activated protein kinases) y la activación del $NF-\kappa B$ (Erhardt A y cols. 2002, Yoshida H y cols. 2001).

Además, como ya se ha comentado, la proteína C se une a la apolipoproteína II, y su interacción con las vesículas lipídicas facilita el desarrollo de esteatosis relacionada con el VHC (Perlemuter G y cols. 2002).

- Proteínas de la envoltura

Los genes E1 y E2 codifican las proteínas de la envoltura gp31 (E1) y gp70 (E2) respectivamente. El extremo N-terminal de las proteínas E1 y E2 son los aminoácidos en las posiciones 192 y 384 respectivamente de la proteína precursora, y los aminoácidos en las posiciones 746 y 809 son identificados como el extremo C-terminal de la proteína E2, denominándose E2 (E2-A) y E2-p7 (E2-B). No está clara la función de la proteína p7 y si es o no un componente de las partículas virales (Kato N. 2001). Estas proteínas están presentes en la envoltura del virión y participan en la adhesión de los viriones a la membrana de las células huésped para infectarlas.

La proteína E2 interacciona con receptores virales, el CD81 (Agnello V y cols. 1999) y el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDLR) (Pileri P y cols. 1998); el LDLR es utilizado por las partículas virales para entrar en la célula; no así el CD81 (Wünschmann S y cols. 2000, Takikawa S y cols. 2000).

La proteína E2 activa los promotores de 2 proteínas intraluminales, el GRP78 y el GRP94, pudiendo estar implicada en la patogenia de las enfermedades inducidas por VHC, ya que la sobreexpresión de GRP78 es un sensor de estrés en el retículo endoplásmico y parece disminuir la sensibilidad de las células a la apoptosis mediada por linfocitos T citotóxicos (LTC) (Liberman E y cols. 1999).

Además, la proteína E2 interacciona e inhibe la actividad de una protein-cinasa de doble cadena de ARN (PKR), pudiendo ser esta interacción parcialmente responsable de la resistencia del virus al tratamiento antiviral con interferón (IFN) (Taylor DR y cols. 1999).

Entre las regiones E1 y E2 se encuentra una zona denominada hipervariable (HVR1), de unos 27 aminoácidos de longitud. Sus principales características son: 1) se localiza en la superficie de la proteína de la envoltura E2 y tiene epítomos de células B; 2) presenta una diversidad del 80% en la secuencia de aminoácidos; 3) su complejidad no se correlaciona con la severidad de la enfermedad hepática, el genotipo del VHC, o la carga viral; 4) es rica en residuos de serina y treonina, y 5) son raros los residuos cisteína. Esta región hipervariable, HVR1, permite al virus escapar del sistema inmune y, por tanto, favorece la aparición de infecciones persistentes y fracasos terapéuticos (Kmieciak D y cols. 2005, Abbate I y cols. 2004). Existe otra región hipervariable, HVR2, constituida por 7 aminoácidos y localizada entre las posiciones 91 y 97 de la proteína de la envoltura. Presenta una diversidad de un 100% de aminoácidos y no presenta epítomos de células B (Kato N. 2001).

Por tanto, E1 y E2 estarían implicadas en la unión a receptores celulares y su posterior fusión, es decir, en la entrada del virus dentro de las células del huésped.

1.1.3 Proteínas no estructurales (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, y NS5B)

Las proteínas no estructurales (NS) no son componentes de las partículas virales y están relacionadas con la replicación viral. Codifican dos proteasas: metaloproteasa NS2-NS3 dependiente de zinc y serin-proteasa NS3.

La *proteína NS2* parece ser indispensable para la replicación viral aunque su función no está del todo clara.

La *proteína NS3* es una proteína multifuncional que presenta, en el tercio N-terminal, un dominio serin-proteasa, importante para la fragmentación postraducciona de los péptidos virales (Grakoui A y cols. 1993) y, en los dos tercios de la región C-terminal, un dominio NTPasa/ARN helicasa, esencial para desenrollar el ARN viral durante la replicación (Kim JL y cols. 1998); dichas actividades están moduladas por NS4A. Es esencial para la replicación viral y regulación de diferentes funciones del huésped como son, principalmente, el crecimiento y la diferenciación celular (Bartenschlager R. 1999). Los mecanismos intracelulares no se conocen con exactitud aunque se ha observado que NS3 induce la formación de radicales de oxígeno a través de la NADPH oxidasa y regula el p21 y p53. Asimismo interacciona con la protein-cinasa A (PKA) e inhibe su actividad (Kato N. 2001, Bureau C y cols. 2001).

La proteína codificada por NS4A, constituida por 54 aminoácidos, forma un complejo estable con la proteína NS3 y es un cofactor esencial de la proteasa NS3. La proteína codificada por NS4B, p27, de 27 kDa, es rica en residuos de aminoácidos hidrofóbicos y se ha detectado primariamente en la fracción de membrana aunque su función es desconocida.

La *proteína NS5A*, localizada en la membrana periplásmica, tiene múltiples y diversas propiedades aunque la relevancia funcional de muchas de ellas no está clara. NS5A, al igual que la proteína del core, interfiere con el metabolismo intracelular de los lípidos y de las lipoproteínas, con efecto directo en el desarrollo de esteatosis, característico en los sujetos infectados por el VHC (Perlemuter G y cols. 2002). También se cree que es importante en la

regulación del ciclo celular en la célula huésped (Arima N y cols. 2001), ya que interviene en la replicación al modular la actividad polimerasa de NS5B e interaccionar con la proteína karioferina $\beta 3$, que participan en la modulación nuclear y en el transporte celular.

La proteína *NS5A* contiene un dominio capaz de regular la respuesta al interferón; esta zona se denomina ISDR (región determinante de la sensibilidad al interferón) y se encuentra en la zona comprendida entre los aminoácidos 2209 y 2248. Además posee la capacidad de unirse e inhibir la actividad de la protein-cinasa R (PKR) (Tan SL y Katze MG. 2001, Arima N y cols. 2001). Tanto la zona ISDR como el sitio de unión a la PKR están implicados en los fenómenos de variabilidad y resistencia al tratamiento.

La *proteína NS5B* (591 residuos de aminoácidos para VHC-2b) ha sido identificada como una ARN polimerasa dependiente de ARN, importante en el proceso de replicación viral.

1.2 Variabilidad genética del VHC

El virus de la hepatitis C exhibe gran diversidad genética debido a la aparición de múltiples mutaciones puntuales durante el proceso de replicación y a la ausencia de mecanismos de reparación. La heterogeneidad genética puede ser intragenómica, dando lugar a las **cuasiespecies** víricas, e intergenómica, lo que da lugar a los **genotipos** y **subtipos** virales.

La elevada cinética de replicación viral y la baja fidelidad de la enzima responsable de la replicación (ARN polimerasa dependiente de ARN) son los principales factores que explican la elevada variabilidad genética de este virus. El virus tiene una vida media de 2-3 horas en la sangre y posee una alta capacidad de producción diaria de partículas virales (10^{10} - 10^{12}) en los pacientes con hepatitis crónica C (Neumann AU y cols. 1998). La enzima que se encarga de la replicación viral tiene una tasa de error aproximada de 10^{-4} . En un modelo experimental en chimpancés, tomando muestras en la fase aguda de la infección y en la fase crónica (8 años y medio después), se ha demostrado que la tasa de mutación, secuenciando genomas completos de ambas muestras, es de aproximadamente $1,44 \times 10^{-3}$

sustituciones por año, datos que apoyan que la diversidad genética del VHC es el resultado de la acumulación de mutaciones (Kato N. 2001, Okamoto H y cols. 1992). Esta tasa de mutación no es uniforme a lo largo del genoma, siendo menor en 5'UTR y C, mayor en E1 y E2 y máxima en la región hipervariable de E2 (HVR1).

La cronicidad de la hepatitis C se debe a la rápida producción viral y a la falta de una potente respuesta inmune de las células T frente al VHC lo que da lugar a variantes del VHC que escapan del control inmune.

La variabilidad intergenoma da lugar a los conceptos de **genotipo**, **subtipo** y **aislado**. Se denominan **genotipos** a aquellos genomas cuyo grado de homología se encuentra entre el 66-69%; se designan con número arábigo y, hasta el momento, se han identificado 6 genotipos mayores y hasta 11 genotipos distintos. Hablamos de **subtipo** cuando dentro de un mismo genotipo existe un grado de homología entre el 77-80%; se designan con una letra minúscula, que sigue al número que nombra al genotipo; se han descrito más de 100 subtipos distintos. Dentro de un mismo subtipo, se denominan **aislados** a aquellos genomas en los que el grado de homología no es superior al 91-95% (Bukh J y cols. 1995).

Cuando analizamos las variaciones de secuencias entre los genomas que infectan a un individuo (variabilidad intragenoma) observamos que una variación en la secuencia de nucleótidos provenientes de mutaciones acaecidas durante la replicación viral ha dado lugar a la presencia de **cuasiespecies**. La tasa de cambios en los nucleótidos varía de forma significativa entre las diferentes regiones genómicas, con una tasa global de mutación de entre 0.144% y 0.192% de cambios de nucleótidos por año. La región del genoma del VHC que presenta mayor frecuencia de cambios de nucleótidos, es decir, responde de la aparición de cuasiespecies, es la región hipervariable 1 (HVR1), de 27 aminoácidos de longitud y que comienza en la región N-terminal de la proteína de la envoltura E2 (Kato N. 2001). La diversidad de cuasiespecies del VHC puede contribuir a la cronicidad de la infección así como al escape inmune, debido a los cambios en las proteínas de la envoltura.

Categorías	Homologías (%)
• Genotipo	66-69
• Subtipo	77-80
• Aislado	91-95
• Cuasiespecies	>98

Existen pacientes infectados por más de un genotipo o subtipo, lo que se denomina infección mixta.

En un mismo paciente sólo se han descrito variantes intragenoma, y no variantes intergenoma, lo que quiere decir que no se ha demostrado el cambio de genotipo o de subtipo. Los genotipos no cambian durante el curso de la infección por lo que no necesitan ser identificados de nuevo, pero sí se han observado diferencias en cuanto a la distribución geográfica, modo de adquisición y grado de respuesta al tratamiento viral entre genotipos (Bukh J y cols. 1995).

Al igual que ocurre con otros virus, las células hepáticas infectadas por el virus C producen o fabrican partículas virales (viriones) o virus maduros que, a su vez, son liberados a la sangre por la que circulan e infectan a otras células sanas. La cantidad de partículas víricas que circulan por la sangre es la **carga viral**, que expresa la concentración de ARN del virus.

1.2.1 Implicaciones de la variabilidad genética del VHC

Existen diferentes implicaciones de la variabilidad genética en la patogenicidad, en los fenómenos de resistencia al tratamiento así como en la epidemiología del virus.

1. Importancia en la patogenicidad

a. En la gravedad de la infección

La región HVR1 del VHC contiene ciertos epítomos que podrían seleccionar mutantes capaces de escapar del sistema inmune. A mayor gravedad del

proceso, mayor número de cuasiespecies. Así, las hepatitis agudas en resolución tienen un menor número de cuasiespecies que las crónicas activas (Kmieciak D y cols. 2005, Abbate I y cols. 2004).

Además, la infección por genotipo 1b muestra una evolución más rápida y frecuente hacia la cirrosis y el hepatocarcinoma y responde peor al interferón (Farci P y Purcell RH. 2000).

b. En las manifestaciones extrahepáticas

Los sujetos infectados por VHC presentan con mayor frecuencia crioglobulinemia aunque no se ha visto relación con los distintos genotipos.

c. En la aparición de hepatocarcinoma (HCC)

El gen de la PKR (*proteína mayor inducida por el interferón*) se considera supresor de tumores y controlador de la homeostasis y del crecimiento celular (Hiasa Y y cols. 2003). En determinadas condiciones, la PKR interacciona con la región NS5 del virus, lo que lleva consigo su inactivación, facilitando el desarrollo de hepatocarcinoma (De Mitri MS y cols. 2002). Además, la expresión de la región NS3 ha ido seguida del desarrollo de tumores en determinados modelos animales. Actualmente, se están estudiando mutaciones que afecta a diferentes aminoácidos codificados por el genoma vírico, e incluso el papel de la proteína F (producto del frame-shift de algunas cepas 1b en la zona del core y cerca del codón 11) (Nishise Y y cols. 2007).

2. Importancia en el tratamiento

La duración del tratamiento combinado con interferón pegilado (Peg-IFN) y ribavirina (RBV) y la dosis de esta última se deciden según el genotipo, de acuerdo con las guías clínicas actualmente en vigor. En la actualidad se acepta que en los sujetos con genotipos 2 o 3, dada la alta tasa de respuesta virológica sostenida (RVS) (>70-80%), es suficiente tratar durante 24 semanas y con dosis

de 800 mg/día de RBV (Hadziyannis SJ y cols. 2004). Sin embargo, los pacientes infectados con genotipo 1 (y probablemente los demás) deben ser tratados durante 48 semanas y con dosis de RBV entre 1000 y 1200 mg/día, según el peso, dado que la tasa de RVS es menor (40-45%) (Hadziyannis SJ y cols. 2004).

Este fenómeno podría explicarse a través de un mecanismo que implica la vía NS5. La PKR es una proteína que, además de ser supresora de tumores, es capaz de bloquear la expresión de genes víricos. La interacción de la PKR con la región NS5A puede inhibir la fosforilación de esta enzima y, secundariamente, su actividad cinasa. En los genotipos 1a y 1b se ha descrito una interacción entre la proteína NS5A y el sitio catalítico de PKR, siendo éste el primer mecanismo descrito por el que el virus podría hacerse resistente al interferón (Xiang J y cols. 2005, Rivas-Estilla AM y cols. 2002). Por otro lado, se ha señalado la existencia en la proteína NS5A de una región, denominada ISDR (*región de sensibilidad al interferón*), situada entre los aminoácidos 2209-2248, aislada en sujetos con mala respuesta y genotipo 1b; el estudio de esta región podría predecir el tipo de respuesta al tratamiento (Enomoto N y cols. 1995).

3. Importancia en epidemiología

a. Variabilidad geográfica

La gran variabilidad geográfica en la distribución de los genotipos virales se podría explicar en parte por los movimientos poblacionales, el uso de drogas por vía parenteral y la contaminación por transfusiones sanguíneas, además de por el lugar específico de emergencia de cada genotipo. En España, resto de Europa y América del Norte, el genotipo predominante es el 1 (70%) seguido del 2 y del 3 (25%). En cambio, en zonas de Asia y Japón predominan los genotipos 2 y 3. En África del Norte y Central y Oriente Próximo es más frecuente el genotipo 4. El genotipo 5 predomina en África del Sur, y del 6 al 11 en el sudeste asiático. Sin

embargo, los movimientos migratorios actuales podrían estar reduciendo gradualmente las diferencias geográficas entre los distintos genotipos (Seeff LB y Hoofnagle JH. 2002, Yoshioka K y cols. 1992, Dusheiko G y cols. 1994, Mellor J y cols. 1995).

b. Vacunaciones. La gran variabilidad del VHC hace muy difícil la creación de una vacuna útil.

2. Epidemiología del virus C

La infección por el virus de la hepatitis C (VHC) es la causa más importante de enfermedad crónica hepática y muerte por hepatopatía en el mundo. Según la Organización Mundial de la Salud, el 2.2% de la población mundial, aproximadamente 130 millones de personas, pueden presentar infección crónica por el VHC, aunque la mayoría pueden estar clínicamente asintomáticos (Alter MJ. 2007). Existe gran variabilidad geográfica y demográfica incluso existen dentro de una misma región (Lauer GM y Walker BD. 2001, Perz JF y cols. 2004).

Es difícil conocer con exactitud la incidencia de infección por VHC, dado que la infección aguda suele ser asintomática, pero parece que la esta incidencia ha disminuido desde finales de la década de los ochenta. Actualmente se estima que en Estados Unidos se producen unos 35.000 nuevos casos de infección por VHC al año, por lo que se prevé que el número de diagnósticos de hepatitis crónica C aumentará hasta cuatro veces entre los años 1990-2015 (Seeff LB y Hoofnagle JH. 2002).

En Europa, y en particular en los países mediterráneos, la prevalencia de la hepatitis crónica por VHC presenta un aumento paralelo a la edad de los sujetos (1,7% en menores de 44 años vs 4,1% en mayores de 65 años), mientras que en Estados Unidos es más frecuente en sujetos entre los 30 y 49 años (Kim WR. 2002). Por otra parte, la frecuencia de la hepatitis C varía también según la parte del mundo en que se analice, así los países con

mayor prevalencia se encuentran en África (Egipto 15-20%) y Asia (Japón 10-14%) mientras que las áreas de menor prevalencia se encuentran en países industrializados de Europa, Norteamérica y Australia (Darwish NM y cols. 1992, Kiyosawa K y cols. 1994, Shepard CW y cols. 2005) (**figura 4**).

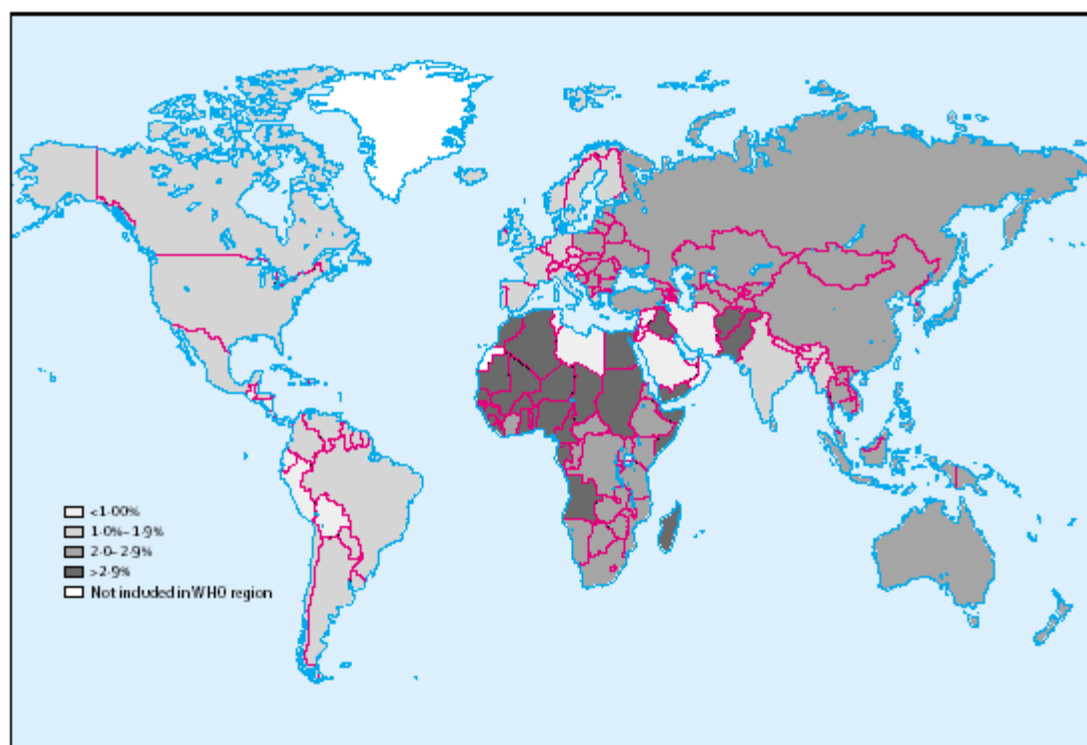


Figura 4: Prevalencia estimada de la infección por el VHC (datos de la OMS)

Adaptado de Perz JF y cols. Estimated global prevalence of hepatitis C virus infection. 42nd Annual Meeting of the Infectious Diseases Society of America; Boston, MA; Sept 30-Oct 3, 2004

En España la prevalencia del VHC en estudios epidemiológicos poblacionales se estima entre el 1 y el 2,6%, porcentaje similar (1.7%) al obtenido en otros estudios realizados en otros países del área mediterránea, como Francia e Italia (Solá R y cols. 2002). El porcentaje de pacientes anti-VHC positivo con ARN VHC detectable en sangre en nuestro medio es cercano al 70%, lo que permite estimar la existencia en España de unos 800.000 pacientes con hepatitis crónica C (Solá R y cols. 2002, Sacristán B y cols. 1996).

Esta estimación tropieza con la dificultad de que la infección se mantiene silente durante muchos años y puede no detectarse hasta que produce una hepatopatía clínicamente manifiesta. La creciente tendencia a realizar análisis periódicos de salud en la población general influye sobremanera en el incremento de casos de hepatitis crónica C diagnosticados en periodo subclínico.

2.1 Mecanismos de transmisión del VHC

Se han descrito tres vías principales de transmisión del VHC: percutánea (transfusiones de sangre e inoculación por pinchazos de agujas), no percutánea (contacto sexual, exposición perinatal) y esporádica.

Tabla 1: Importancia del patrón de transmisión en el riesgo de infección

Exposición	Bajo	Moderado	Alto
Uso de drogas inyectables	++++	++	+
Transfusiones (previo a screening)	+++	+++	+++
Inyecciones no seguras	+	++++	++++
Ocupacional	+	+	+
Perinatal	+	+	+
Sexo de alto riesgo	++	+	+/-

Adaptado de Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C virus infection. World J Gastroenterol 2007;13:2436-2441.

2.1.1 Transmisión percutánea

La vía percutánea es la vía fundamental de transmisión del VHC.

Antes de 1990, año en que se comienza a realizar la detección sistemática del VHC en donaciones de sangre, la principal vía de infección era la *transfusión de sangre o hemoderivados*. Con la introducción del cribado del VHC en los donantes de sangre en 1991, mediante evaluación de antiVHC de segunda generación, se redujo el riesgo de hepatitis postransfusional de un 10% antes de 1990 a menos del 1% en el momento actual

(Esteban JI y cols. 1990), y se estima que el riesgo actual de transmisión del VHC por unidad de sangre transfundida oscila entre 0.01% y 0.001% (Rumi MG y cols. 1990, Schreiber GB y cols. 1996). Parece que la incidencia de adquisición de la infección por VHC post-transfusión está directamente relacionada con el número y cantidad de productos sanguíneos recibidos (Memon MI y Memon MA. 2002)

Actualmente la vía más importante de contagio del VHC es el uso de jeringuillas contaminadas en pacientes *usuarios de drogas por vía parenteral (UDVP)*, en los que la prevalencia de anti-VHC puede alcanzar hasta el 90%. A diferencia de la hepatitis relacionada con transfusiones, la prevalencia de infección por VHC asociada a UDVP no ha disminuido y esta población permanece como reservorio importante (Wasley A y Alter MJ. 2000).

En cuanto a los pacientes sometidos a *hemodiálisis*, un estudio multicéntrico realizado en España ha comunicado una descenso de la seroprevalencia del VHC en las unidades de hemodiálisis, siendo actualmente inferior al 18% (datos del año 2000). Inicialmente, en el año 1991, previo al empleo de técnicas de screening del VHC, ésta era superior al 30% (Barril G y Traver JA. 2003). Un estudio español ha comunicado una tasa de conversión del 7% (Forns X y cols. 1997). La probabilidad de adquirir la infección aumenta con el número de transfusiones recibidas y el tiempo transcurrido en programa de diálisis. El mecanismo exacto de transmisión se desconoce, pero puede deberse a la falta de cumplimiento de las medidas universales de prevención de las enfermedades transmisibles por la sangre.

También se han descrito casos de infección por VHC en *trasplantados de órganos* (hígado, riñón, médula ósea, etc.), así como tras *pinchazo accidental con material contaminado*. En este último supuesto el riesgo de seroconversión a anti-VHC es bajo, con tasas que oscilan entre el 0 y el 1,9% en estudios realizados en España (Hernandez ME y cols. 1992, Perez-Trallero E y cols. 1994).

Otras vías posibles de infección por el VHC son los tatuajes, la acupuntura, el *piercing*, etc. En estos casos se podría reducir el riesgo usando material desechable.

También se ha demostrado inoculación percutánea del VHC al compartir utensilios de aseo, como maquinillas de afeitar o cepillos de dientes (Tumminelli F y cols. 1995).

2.1.2 Transmisión no percutánea

Más de la mitad de los pacientes con positividad para anti-VHC no refieren ningún antecedente de transmisión parenteral, lo que lleva a considerar otras vías de infección.

Los modos no percutáneos de transmisión del VHC incluyen la transmisión entre parejas sexuales y la transmisión perinatal.

Las *parejas sexuales de pacientes infectados por VHC* tienen tasas de prevalencia de la infección bajas (Schreiber GB y cols. 1996). La prevalencia estimada de infección por el VHC entre las parejas heterosexuales con relaciones monógamas oscila entre el 2,8 y el 11% en el sudeste de Asia, entre el 0% y el 6,3% en el norte de Europa y es del 2,7% en Estados Unidos (Terrault NA. 2002). En personas con relaciones monógamas de larga duración el riesgo de adquisición del VHC es menor (0%-0,6% al año) que en aquellos sujetos con múltiples parejas (0,4%-1,8% al año) (Terrault NA. 2002). El riesgo de transmisión del VHC es mayor en las parejas infectadas por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y si padecen enfermedades de transmisión sexual. En un estudio realizado en España se ha observado una prevalencia del anti-VHC del 3,3%, sin existir concordancia genotípica entre el individuo índice y el familiar afecto (Esteban JI y cols. 1989), lo que va en contra de la eficacia de este mecanismo de transmisión.

La *transmisión perinatal* del VHC es poco frecuente, su incidencia oscila entre el 4-7%, aunque es mayor, alrededor del 20%, si la madre está coinfectada por el VIH o presenta una carga viral elevada, sobre todo durante el tercer trimestre (Thaler MM y cols. 1991, Diago M y cols. 1996, Conte D y cols. 2000, Gibb DM y cols. 2000, Okamoto M y cols. 2000). No se ha podido establecer si la transmisión ocurre intraútero o tras el contacto con sangre en el canal del parto. No se ha observado correlación entre el genotipo y la tasa de transmisión del virus (Zanetti AR y cols. 1999) aunque sí se ha observado que la amniocentesis aumenta

el riesgo potencial de transmisión del virus (Minola E y cols. 2001). En un estudio reciente realizado en el Reino Unido se demuestra que la cesárea electiva antes de que se produzca la rotura de la bolsa amniótica disminuye significativamente el riesgo de infección por el VHC respecto al parto vaginal o la cesárea urgente (0,7, 7y 5,9% respectivamente) (Gibb DM y cols. 2000), pero en otro estudio publicado en el año 2001, Yeung LT y cols., observan una tasa de transmisión del VHC del 3% si se realizaba cesárea y del 4,3% si se trataba de parto vaginal, por lo que estos autores no recomendaban la práctica de cesárea de rutina en las pacientes con VHC sin VIH (Yeung LT y cols. 2001).

2.1.3 Infección esporádica por VHC

En un 10-30% de los casos no se conoce la vía de adquisición del virus C (Seeff LB y Hoofnagle JH. 2002, Alter MJ. 2002).

La infección “esporádica” por VHC puede provenir de una vía percutánea o no percutánea predominante no identificada. En este momento toma importancia la transmisión nosocomial, ya que muchos sujetos tienen antecedentes de hospitalización, tanto médica como quirúrgica. Un estudio español muy reciente pone de manifiesto la importancia de este mecanismo, ya que el 67% de los 109 casos de hepatitis aguda por virus C registrados en varios hospitales catalanes entre 1998 y 2005 tenían como único antecedente de riesgo el haber estado ingresados en un hospital, tanto por procesos médicos como quirúrgicos o procedimientos intervencionistas (Martínez-Bauer y cols. 2008). Evidentemente este riesgo es inaceptable para el sistema sanitario y debe haberse el máximo esfuerzo para eliminarlo de nuestros hospitales (Alter MJ. 2008).

3. Patogenia

La hepatitis crónica C es el resultado de una respuesta inmune insuficiente que induce destrucción de células hepáticas y fibrosis pero que es incapaz de eliminar el virus (Heydtmann M y cols. 2001). Los mecanismos de persistencia viral y de lesión hepatocelular

en pacientes con infección crónica por VHC no están bien comprendidos y pueden ser diversos.

En términos generales, la infección viral puede producir lesión celular directa mediante citotoxicidad así como lesión indirecta mediada por el sistema inmune (Cerny A y Chisari FV. 1999). En la infección crónica por virus C adquieren un papel relevante el estrés oxidativo y la esteatosis hepática (Okuda M y cols. 2002). Además la esteatosis puede favorecer el desarrollo de fibrosis hepática (Okuda M y cols. 2002, Monto A y cols. 2002).

Aproximadamente un 85% de los pacientes infectados por el VHC desarrollan una infección crónica y sólo un 15% curan por completo de la hepatitis aguda (Marcellin P. 1999). La gravedad de la enfermedad hepática varía desde una infección crónica asintomática con tests hepáticos normales hasta una cirrosis o un carcinoma hepatocelular.

3.1 Mecanismos implicados en la persistencia de la infección por VHC

La respuesta inmune celular es crucial para la eliminación o persistencia de la infección por el VHC. Las células T CD4+ y sus citocinas con actividad pro-inflamatoria y reguladora parecen jugar un papel importante en la inmunopatogénesis de la infección crónica por el VHC. Las células T CD4+ son polarizadas hacia una respuesta de tipo 1 o de tipo 2 (Th1 o Th2). Las células Th1 secretan interleucina 2 (IL-2) e interferón gamma (IFN γ), que son importantes en la respuesta antiviral del huésped que se articula mediante la generación de linfocitos T citotóxicos (LTC) y la activación de las células *natural killer* (NK). Las células Th2 producen IL-4 e IL-10, las cuales favorecen la producción de anticuerpos e inhiben la respuesta Th1. Se cree que un desequilibrio entre las respuestas Th1 y Th2 puede estar implicado en la progresión de la infección e incapacidad para eliminar la misma (O'Garra A. 1998, C y Flavell RA. 2001).

Los pacientes con infección aguda por VHC que son capaces de eliminar el virus desarrollan una fuerte respuesta Th1 y una débil respuesta Th2. Al contrario, los pacientes que presentan una infección crónica por el VHC muestran una respuesta

predominantemente Th2 y una débil respuesta Th1 (Gonzalez-Peralta RP y cols. 1994). Estas observaciones sugieren que el efecto de las citocinas Th1 es crucial para la protección contra la infección del VHC, mientras que la producción de citocinas Th2 puede tener un efecto inhibitor del sistema inmune y por tanto favorecer la persistencia de la infección por VHC.

3.2 Heterogeneidad del VHC

La alta tasa de replicación viral diaria (10^{10} - 10^{12}) en los pacientes con hepatitis crónica C y la corta vida media del virus (4-7 horas) favorece la aparición de mutaciones. Se estima que la frecuencia de mutaciones espontáneas es de un 10^{-2} a 10^{-3} sustituciones de nucleótidos por año. Como consecuencia de esto, la población viral es muy heterogénea y emergen múltiples cuasiespecies (Bukh J y cols. 1995), lo que facilita el escape del virus de la inmunidad humoral y celular y el cambio de tropismo celular (linfotropeo versus hepatotropeo), y explica la dificultad para obtener una vacuna y el rápido desarrollo de resistencia al tratamiento y la persistencia de la infección (Zeuzem S y cols. 1996).

3.3 Mecanismos implicados en las lesiones hepáticas

El VHC no es un virus directamente citopático. El proceso necroinflamatorio es el resultado del reconocimiento inmune y de la destrucción de los hepatocitos infectados. Se cree que el principal mecanismo responsable de las lesiones hepáticas es la respuesta de las células T. Así, en hígado se ha detectado aumento tanto de células T helper como citotóxicas y se considera que el exceso de producción de citocinas tipo Th1 es el responsable de las lesiones necroinflamatorias. Este proceso continuo necroinflamatorio es ineficiente para la eliminación del virus y probablemente sea el que desencadena los procesos de fibrogenesis responsables de la progresión de la enfermedad (Boyer N y Marcellin P. 2000).

Este apartado se tratará con mayor profundidad en posteriores capítulos de esta introducción.

4. Clínica e historia natural de la enfermedad

La infección por el VHC supone un problema de salud pública de primer orden a escala mundial. Se estima que existen unos 170 millones de personas infectadas. Aparte de la dificultad de establecer con seguridad la prevalencia, el conocimiento de la historia natural de esta infección presenta obstáculos notables: 1) el momento inicial de la infección no se conoce en la mayoría de los casos, debido a que la infección aguda casi siempre es asintomática, 2) el curso evolutivo se prolonga durante décadas, 3) no puede fijarse un punto final de la evolución (el desarrollo de cirrosis podría serlo, pero puede ir seguida de la aparición de hepatoma), y 4) al poco tiempo de la identificación del VHC se dispuso de un tratamiento capaz de modificar la evolución natural de la infección.

La infección por VHC puede dar lugar a distintos cuadros clínicos según se trate de una infección aguda o crónica.

4.1 Hepatitis aguda

El VHC es responsable de alrededor del 20% de los casos de hepatitis aguda. Sin embargo, en la práctica clínica la infección aguda es asintomática o subclínica en la mayoría de los casos (más del 70%). La ictericia aparece en no más del 20-25% de los casos, un 10%-20% de los pacientes pueden desarrollar síntomas inespecíficos como astenia, náuseas y vómitos, indistinguibles de los síntomas de otro tipo de hepatitis viral aguda y de otras muchas enfermedades agudas, siendo raros los casos de disfunción severa o fallo hepático (Alter HJ y Seeff LB. 2000).

En la hepatitis aguda por VHC clínicamente manifiesta se distinguen cuatro períodos: incubación, pródromos, estado y convalecencia.

-Período de incubación: intervalo entre la exposición al virus y la aparición de los primeros síntomas. Es variable y oscila entre 2 y 12 semanas, con una mediana de 7 semanas, acortándose cuanto mayor sea la cantidad de viriones del inóculo.

Se ha comprobado que los pacientes que presentan síntomas tienen más posibilidades de curarse y no desarrollar infección crónica. Un estudio reciente ha demostrado que el 52% de los casos de hepatitis aguda sintomática por VHC se resolvieron espontáneamente, circunstancia que no se produjo en los casos asintomáticos (Gerlach JT y cols. 2003).

-Período prodrómico: comprende el tiempo en el cual el paciente presenta síntomas antes de la aparición de ictericia; su duración es variable o puede no estar presente. Se caracteriza por astenia y anorexia, a veces acompañadas de náuseas y vómitos, así como de dolor en el hipocondrio derecho, junto con sensación de distensión abdominal.

-Fase de estado: periodo en el que el paciente comienza con síntomas. La ictericia aparece en no más del 20-25% de los casos y es de intensidad y duración variables, oscilando desde una leve coloración amarillenta de escleróticas hasta un intenso color amarillo verdoso de piel y mucosas, así como con orina colúrica y heces hipocólicas. Persiste la astenia y en ocasiones se observa pérdida de peso a pesar de una ingesta calórica normal. Son raros los casos de disfunción severa o fallo hepático fulminante (Farci P y cols. 1996).

-Periodo de convalecencia: disminuye de forma gradual la ictericia, se recupera el apetito y se normaliza el color de la orina y de las heces.

Exploración física: además de la ictericia, si la hay, se observa en la mayoría de los pacientes una hepatomegalia moderada, blanda y ligeramente dolorosa así como esplenomegalia en el 10-25% de los casos.

Alteraciones analíticas: Las alteraciones más constantes son la elevación de la bilirrubina (BR), con aumento de ambas fracciones si aparece ictericia, aunque su valor no suele exceder los 12 mg/dl y desaparece de forma característica en un mes. Además, entre las semanas 2 y 8 desde la exposición al virus se observa una elevación de las transaminasas séricas (alanino amino transferasa (ALT), aspartato amino transferasa (AST)), que pueden alcanzar valores superiores a 10 veces el valor normal, aunque por lo general presentan un patrón fluctuante. La fosfatasa alcalina (FA) se encuentra moderadamente elevada así como la gamma glutamil transferasa (GGT). La velocidad de sedimentación globular (VSG), el proteinograma, el hemograma y las pruebas de coagulación son habitualmente normales (Alter HJ y Seeff LB. 2000, Thimme R y cols. 2001).

Diagnóstico: El diagnóstico de hepatitis aguda suele establecerse por criterios clínicos y analíticos, recurriéndose en raras ocasiones a la biopsia hepática.

No existen tests diagnósticos capaces de distinguir entre infección aguda o exacerbación aguda de hepatitis crónica C. Entre la primera y la segunda semana de la exposición al virus es posible detectar en suero mediante la reacción en cadena de polimerasa (PCR) positividad para el ARN del virus C, siendo el primer marcador de infección (Hino K y cols. 1994). El ARN-VHC se detecta en suero mientras existe replicación, es decir, durante unas semanas en los casos de hepatitis autolimitada e indefinidamente en los casos de evolución a la cronicidad. La persistencia de un resultado positivo durante más de 6 meses tras la manifestación clínica debe inducir una fuerte sospecha de evolución crónica. Además se observa positividad para anti-VHC, presente tanto en las infecciones crónicas como en la hepatitis curada, aunque en un 30% de los casos persisten negativos hasta incluso 6-9 meses después de la infección (**figura 5**).

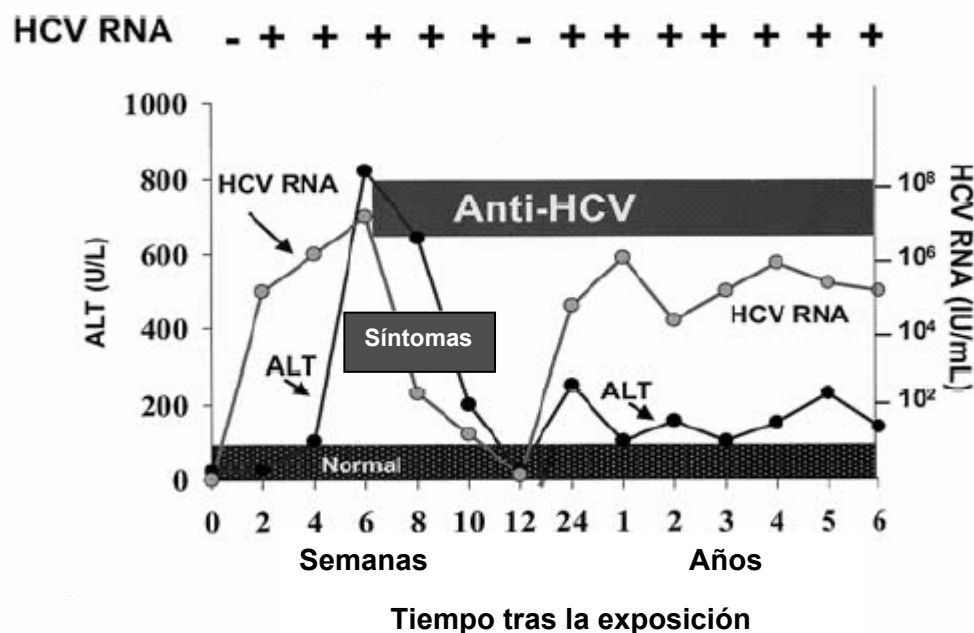


Figura 5: Curso hacia la cronicidad de la hepatitis aguda por VHC

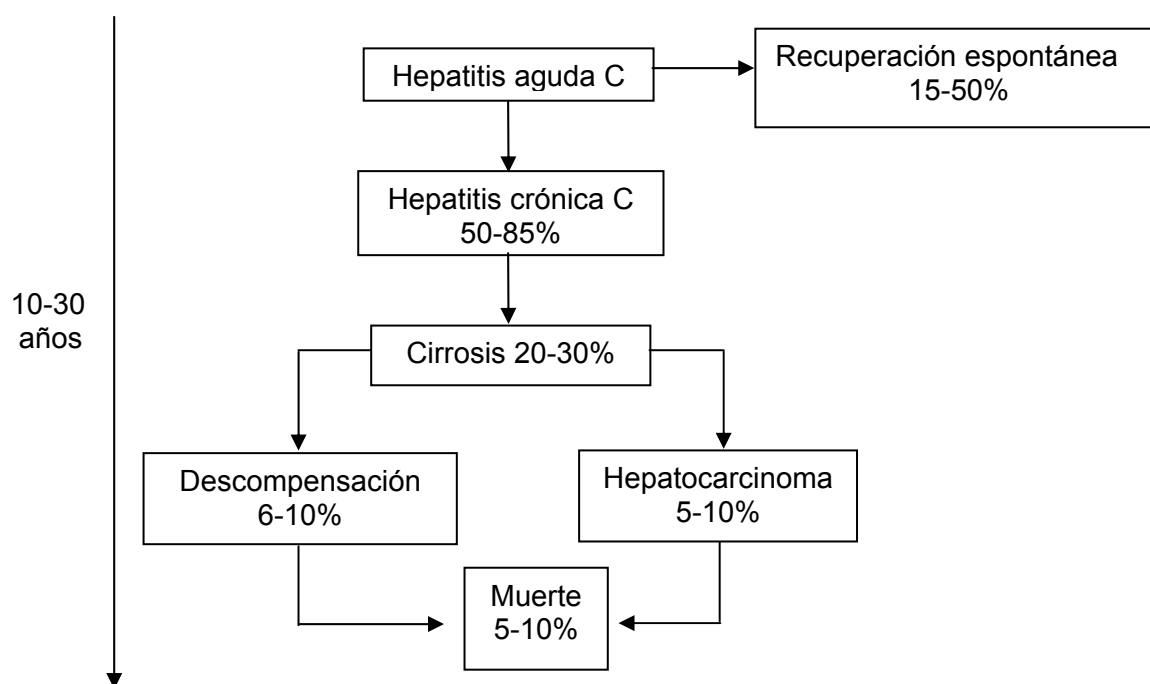
Adaptado de Hoofnagle JH. Course and outcome of hepatitis C. Hepatology 2002;36:S21-S29

Evolución: Tras la infección aguda, sólo una pequeña proporción de sujetos, alrededor del 15-20%, consigue eliminar el virus y, por tanto, curar la infección aunque en estudios transversales la tasa de curación espontánea es más alta, alrededor del 45-50% (Shakil AO y cols. 1995, Wiese M y cols. 2000), por lo que la tasa de recuperación espontánea de la infección aguda por el VHC puede establecerse entre el 15% y el 45%. La resolución completa de la infección se define como la ausencia de ARN-VHC en suero acompañada de la normalización completa de los niveles de transaminasas. El periodo de tiempo en que se considera que la infección se hace crónica se ha establecido tradicionalmente en 6 meses, aunque excepcionalmente la curación puede producirse hasta 1 año después del contacto inicial.

El índice de cronicidad ha variado con el paso del tiempo, en los años noventa era superior al 85-90% en pacientes que habían adquirido el virus tras transfusión sanguínea,

pero en recientes estudios se ha comprobado que esta cifra puede variar entre el 40-50% y el 90-100%, lo que depende de diversos factores (Alberti A y Benvegnù L. 2003) (**figura 6**).

Figura 6: Evolución clínica de la infección por el VHC



El paso o no a la cronicidad depende de la interacción de múltiples factores inherentes tanto al propio virus (variabilidad genética y carga viral), al huésped, especialmente la edad (más de 40 años), sexo (masculino), raza (menor cronicidad en afroamericanos) y estado inmunológico, así como factores externos (consumo de alcohol, tabaco y contaminantes ambientales) (Alberti A y Benvegnù L. 2003, Berenguer M y cols. 2000, Benhamou Y y cols. 1999, Gordon SC y cols. 1993) (**tabla 2**).

Tabla 2: Factores que influyen en la progresión de la hepatitis crónica C

1. Factores virales	Tamaño del inóculo
	Genotipo
	Cuasiespecies
2. Factores del huésped	Edad >40 años
	Sexo masculino
	Raza
	Estado inmunológico y predisposición genética
	Coinfección VIH / VHB
	Coexistencia de otras enfermedades: Hemocromatosis, Esteatohepatitis no alcohólica, Obesidad
3. Factores externos	Esquistosomiasis
	Alcohol
	Tabaco
	Contaminantes ambientales

Adaptado de Alberti A, Benvegnù L. Management of hepatitis C. J Hepatol 2003;38:S104-S118

4.2 Hepatitis crónica

Definición: Enfermedad inflamatoria crónica del hígado de más de 6 meses de duración cuyo sustrato morfológico se caracteriza por la asociación de fenómenos inflamatorios, necrosis celular y, en muchos casos, fibrosis.

Cuadro clínico y analítico: La mayoría de los pacientes con hepatitis crónica C se encuentran asintomáticos o con pocos síntomas. Entre los más comunes se encuentran fatiga, cuya intensidad no se relaciona en forma necesaria con la gravedad de la enfermedad hepática subyacente, dolor en el cuadrante superior derecho del abdomen, dispepsia y náuseas.

Generalmente, las concentraciones de transaminasas se encuentran elevadas de forma continua, presentando en algunos pacientes valores muy fluctuantes e incluso periodos de normalidad. En un 30% de los sujetos se mantienen repetidamente normales.

Se detecta positividad en la determinación de ARN-VHC en sangre, como expresión de la replicación del virus en el hígado, pero la concentración en sangre no guarda relación con la gravedad de la enfermedad hepática.

Evolución clínica: La hepatitis crónica C puede evolucionar a una cirrosis e incluso a un carcinoma hepatocelular (CHC). Sin embargo, no se conoce con exactitud si la progresión de la enfermedad se produce de forma lineal e inexorable en todos los pacientes, o si bien se relaciona con la existencia de otros factores dependientes del propio virus, del enfermo o de tipo externo. Además, el ritmo de progresión de la lesión histológica hepática varía extraordinariamente de unos pacientes a otros.

Así se han determinado una serie de factores que acelerarían la fibrosis, como son la duración de la infección, la edad (>40 años), el sexo masculino, el consumo de alcohol, la existencia de coinfección por VHB y/o VIH, niveles bajos de CD4, la carga viral en el momento de la infección y posiblemente el genotipo (Poynard T y cols. 2003, Pessione F y cols. 2001) (**tabla 3**).

Tabla 3: Factores que favorecen la progresión hacia la fibrosis hepática

Asociados	Posiblemente asociados	No asociados
Estadio fibrosis	Inflamación	Carga viral sérica
Edad de infección	Heterocigoto hemocromatosis	Modo infección
Tiempo evolución	Consumo tabaco	Carga viral hepática
Edad a la biopsia	Consumo moderado de alcohol	
Consumo alcohol >50g/día	Genotipo	
Coinfección VIH/VHB	Esquistosomiasis	
CD4 <200/mL		
Sexo masculino		
Necrosis		
Índice de masa corporal		
Diabetes		
Esteatosis		

Poynard T y cols. Viral hepatitis C. Lancet 2003;362:2095-2100

Con todo lo mencionado anteriormente, se puede afirmar que aproximadamente en el 50-85% de los sujetos que sufren infección por el VHC está evolucionará a la cronicidad. De éstos, el 20% desarrollaran una cirrosis a los 30 años de la infección; la tasa de riesgo anual de desarrollar un hepatocarcinoma una vez establecida la cirrosis es del 3% (**figura 7**).

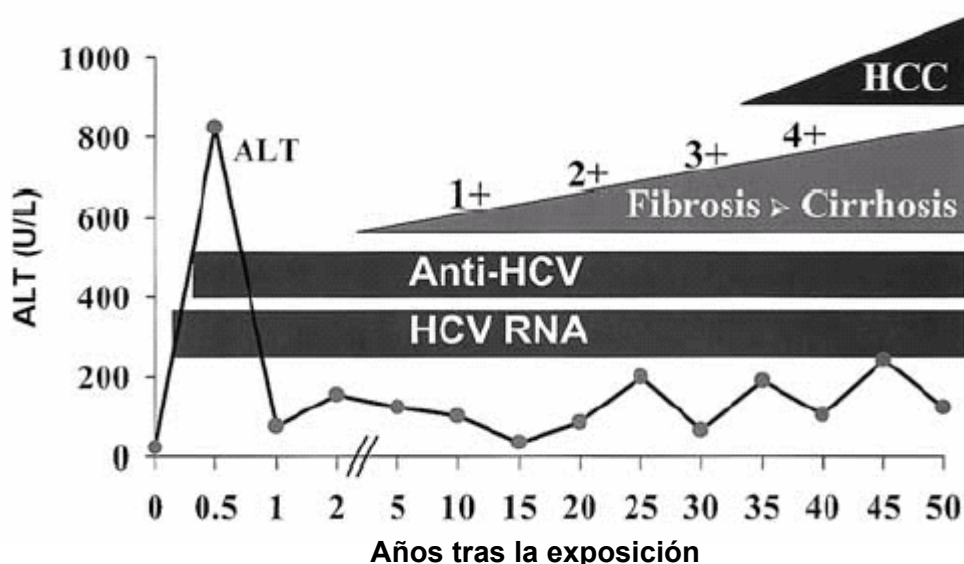


Figura 7: Historia natural de la hepatitis crónica C

Adaptado de Hoofnagle JH. Course and outcome of hepatitis C. *Hepatology* 2002;36:S21-S29

4.3 Manifestaciones extrahepáticas de la infección por el VHC

Las manifestaciones extrahepáticas se desarrollarán en alrededor del 1% al 2% de los pacientes infectados por VHC, no ocurren en la fase aguda sino en la fase crónica y a veces conducen al diagnóstico de la hepatopatía crónica debido a la escasa relevancia de la misma (García-Buey L y García Monzón C. 2001).

Entre las manifestaciones extrahepáticas se incluyen la glomerulonefritis membranoproliferativa, crioglobulinemia mixta esencial, porfiria cutánea tarda, vasculitis leucocitoclástica, sialoadenitis linfocítica focal, úlceras corneales de Moren, liquen plano, artritis reumatoide, linfoma no Hodgkin y diabetes mellitus (Zignego AL y Brechot C. 1999, Agnello V y De Rosa FG. 2004) (**tabla 4**). La infección por VHC se relaciona de forma

estrecha con la patogenia de la glomerulonefritis membranoproliferativa (GNMP) y la crioglobulinemia mixta esencial (CME), quizás debido al depósito de complejos inmunes. En el 50% al 90% de los enfermos con CME aparecen anticuerpos antiVHC en suero; además, en alrededor de la mitad de los infectados por VHC aparecen crioglobulinas. Sólo aparecen síntomas en el 25% a 30% de los infectados por VHC con crioglobulinemia y estos síntomas oscilan desde fatiga, artralgias o artritis hasta púrpura, síndrome de Raynaud, neuropatía periférica y glomerulonefritis (Seeff LB y Hoofnagle JH. 2002).

Tabla 4: Manifestaciones extrahepáticas en la infección crónica por VHC

I. DOCUMENTADAS

Crioglobulinemia mixta (tipo II)

Glomerulonefritis crioglobulinémica

Vasculitis necrotizante cutánea (con CM)

II. PROBABLES O COINCIDENTES

Hematológicas:

Linfoma no Hodgkin

Trombopenia idiopática

Anemia hemolítica

Síndrome antifosfolípido

Gammapatía monoclonal

Renales:

Glomerulonefritis sin CME

Cutáneas:

Porfiria cutánea tarda

Liquen plano

Eritema nodoso

Eritema multiforme

Malacoplaquia, urticaria, prurito

Endocrinas:

Hipotiroidismo, tiroiditis autoinmune

Autoanticuerpos antitiroideos

Diabetes mellitus

Oculares:

Sialoadenitis, uveítis, úlcera corneal de Moren

Locomotoras:

Debilidad muscular, artralgias/artritis, artritis reumatoide

Pulmonares:

Fibrosis idiopática pulmonar

Neurológicas:

Leucoencefalopatía multifocal progresiva

Síndrome de Guillain-Barré, neuropatías

Miscelánea:

Panarteritis nodosa, Síndrome de CREST, Lupus eritematoso sistémico

5. Diagnóstico de la infección por el VHC

La clonación y secuenciación del genoma del VHC en 1989 han permitido el desarrollo de técnicas para la identificación de anticuerpos anti-VHC y de fragmentos del genoma del virus (ARN-VHC) en el suero de los pacientes infectados.

Existen métodos diagnósticos directos (análisis moleculares o virológicos) que determinan y cuantifican el ARN viral mediante la detección de los componentes estructurales virales, y métodos indirectos entre los que se encuentran las técnicas serológicas que detectan anticuerpos específicos del VHC.

Las pruebas inmunológicas o serológicas identifican la presencia de anticuerpos frente al VHC (anti-VHC), que indica exposición al virus sin diferenciar entre la infección aguda, la crónica y la resuelta. Sin embargo, los análisis moleculares o virológicos detectan secuencias de ácidos nucleicos virales específicos (ARN-VHC), que indican persistencia de virus (Morishima C y Gretch DR. 1999). Mientras los ensayos serológicos se emplean usualmente para el *screening* y el diagnóstico de primera línea, los ensayos virológicos son necesarios para confirmar la infección activa o monitorizar los efectos del tratamiento.

5.1 Técnicas serológicas

Los tests serológicos detectan anticuerpos frente a diferentes antígenos del core y proteínas no estructurales del VHC. Las principales técnicas serológicas son:

a) El *enzimoinmunoanálisis* o *ELISA*. Se trata de una técnica de cribado o diagnóstico inicial de la hepatitis C, detecta anticuerpos frente al VHC (anti-VHC) que se generan frente a los epítomos de las diferentes proteínas que codifica el genoma viral. Los anticuerpos que se desarrollan son inmunoglobulinas del tipo IgG. En la primoinfección los primeros anticuerpos IgG detectados son frente a las proteínas NS3 y core, posteriormente aparecen frente al resto de proteínas víricas (Pawlotsky JM. 2002). Se han puesto a punto tres generaciones de ELISA para detectar los anti-VHC. Los de tercera generación detectan anticuerpos dirigidos contra epítomos localizados en el core y proteínas no estructurales

NS3, NS4 y NS5. La especificidad y la sensibilidad en pacientes inmunocompetentes es del 99%, siendo un test negativo suficiente en estos casos para excluir el diagnóstico de infección crónica por VHC. En pacientes en hemodiálisis y pacientes con deficiencias inmunes puede haber falsos negativos de ELISA, por lo que en estos sujetos se debe utilizar para el diagnóstico un test que detecte el ARN-VHC (Salvadó M. 2005).

b) La inmunotransferencia con antígenos recombinantes o “inmunoblot” recombinante (RIBA). Se trata de una técnica de confirmación. Se basa en un “inmunoblot”, en el que antígenos individualizados se enfrentan por separado a la muestra problema. Los criterios de interpretación para las técnicas de confirmación son:

1. Positivo: debe presentar reactividad frente a dos o más antígenos.
2. Negativo: cuando no se detecta reactividad frente a ningún antígeno.
3. Indeterminadas: en la que se obtiene sólo una banda de reactividad con un antígeno.

- Uso clínico de las técnicas serológicas

La positividad de los análisis serológicos indica una infección presente o previa, pero no pueden discriminar si se trata de una infección activa o resuelta. Dicho de otro modo, la presencia de anti-VHC aparece tanto en pacientes virémicos con infección activa como en pacientes sin viremia en los que la infección se ha resuelto, ya sea de forma espontánea o tras tratamiento antivírico. En algunos casos una determinación de anti-VHC negativa no excluye la infección por el VHC. Esta situación puede aparecer fundamentalmente en la infección aguda por el VHC (Seeff LB y Hoofnagle JH. 2002) y en pacientes con infección crónica inmunodeprimidos (VIH, fallo renal, crioglobulinemia) en los que la producción de anticuerpos puede estar comprometida (Strader DB y cols. 2004). Cuando se produce la infección aguda, sólo entre el 50% y el 70% de los pacientes desarrollan anticuerpos (Seeff LB y Hoofnagle JH. 2002). En los pacientes inmunocompetentes con resolución espontánea de la infección, los anti-VHC pueden

persistir positivos toda la vida o bien ir disminuyendo paulatinamente y desaparecer en algunos años.

A diferencia de otras infecciones víricas, la respuesta humoral con inmunoglobulinas de tipo IgM no es exclusiva de la primoinfección, ya que se puede detectar en infecciones crónicas, por lo que este marcador no es útil para conocer el momento de la infección (Pawlotsky JM. 1999).

En la práctica clínica, la determinación de los anti-VHC por RIBA ha quedado limitada a comparar un anti-VHC positivo por ELISA en una persona con ARN-VHC indetectable o negativo. En estos casos un RIBA negativo indicaría un resultado falso positivo del ELISA, mientras que un RIBA positivo indicaría que se trata de una infección resuelta (Salvadó M. 2005).

5.2 Técnicas virológicas o moleculares

La infección activa se define por la presencia de ARN-VHC, que puede detectarse entre la 1ª y 3ª semana tras la exposición aguda (Seeff LB y Hoofnagle JH. 2002). En la actualidad, disponemos de métodos de detección cualitativa y cuantitativa del ARN-VHC (Morishima C y Gretch DR. 1999). En los pacientes con hepatitis C, la cantidad de ARN-VHC circulante en suero es limitada, por lo que es necesario amplificar la muestra o la señal de hibridación, y esto se consigue con diferentes métodos o sistemas entre los que se encuentran los basados en la transcriptasa inversa con reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) y transcripción mediada por amplificación (TMA) así como el sistema “Branched” (bADN).

5.2.1 Ensayos cualitativos

En un paciente con infección aguda o crónica por VHC con ELISA positivo debe obtenerse confirmación mediante un test cualitativo. En un primer paso del análisis cualitativo RT-PCR, la transcriptasa convierte el ARN en ADNc (ADN complementario) que es utilizado como molde. Los iniciadores normalmente utilizados son secuencias

que corresponden a la región 5' UTR por ser la región más conservada del genoma. Posteriormente a la extracción del ARN de la muestra, la fase de amplificación viene seguida de la fase de detección mediante una hibridación con sonda específica (Salvadó M. 2005). La prueba de PCR cualitativa para el ARN del VHC (Cobas Amplicor HCV v 2.0, Roche Molecular Systems) es muy sensible y puede detectar desde 50UI/mL de ARN VHC. Un test cualitativo para ARN del VHC confirma la replicación activa del virus pero un test negativo no excluye viremia y puede reflejar sólo un descenso transitorio de la carga viral por debajo del límite de detección del test. Es útil para evaluar la hepatitis aguda o crónica seronegativa cuya causa se desconoce; la enfermedad hepática crónica con varias causas posibles (ej: alcohol); la hepatitis crónica con niveles séricos normales de transaminasas de forma repetida; los lactantes nacidos de madres infectadas por VHC, los pacientes inmunocomprometidos (ej: coinfección por VIH, trasplantados), y para monitorizar el tratamiento.

Los ensayos basados en el sistema TMA (transcripción mediada por amplificación) utilizan un sistema más complejo de reacciones con las enzimas ARN T7 polimerasa y MLV-RT transcriptasa inversa bajo condiciones isotérmicas de amplificación del ARN mediante intermediarios del ADN. Pueden detectar niveles muy bajos de ARN-VHC (5-10 UI/mL) que son imperceptibles con sistemas RT-PCR (Ross RS y cols. 2001, Sarrazin C y cols. 2001). El kit disponible se denomina Versant HCV RNA Qualitative Assay (Bayer Diagnostics División).

5.2.2 Ensayos cuantitativos

El método del bADN (sistema "Branched") de detección del ARN utiliza una sonda de oligonucleótidos en fase sólida que captura el blanco de ARN, seguido de una hibridación secundaria mediante una sonda ramificada (bADN). Para poner de manifiesto la reacción, se añade un complejo de enzima conjugada al que posteriormente se le agrega un sustrato, la quimioluminiscencia producida es proporcional a la cantidad de ARN del blanco (Salvadó M. 2005).

El sistema de RT-PCR también se utiliza para la cuantificación del ARN, añadiendo un control externo o estándar de cantidad de ARN conocida que se amplifica junto con la muestra (PCR competitiva). La comparación de muestra y estándar nos permitirá calcular la concentración de ARN de la muestra (Salvadó M. 2005).

El ensayo de bADN de segunda generación es capaz de detectar alrededor de 250.000 equivalentes virales por mililitro, mientras que los de tercera generación pueden detectar 600 UI/mL. El test Amplicor ofrece una medición semicuantitativa del ARN viral; el límite inferior de detección es de alrededor de 1.000 copias virales por mililitro o 600 UI/mL. Desde hace menos tiempo se dispone de técnicas de PCR en “tiempo real”, como la denominada Cobas TaqMan HCV Test (Roche Molecular Systems) con un límite de detección de 43-69 a 10⁹ UI/mL.

La determinación cuantitativa del VHC aporta información decisiva sobre la respuesta al tratamiento en pacientes con tratamiento antiviral.

5.2.3 Determinación del genotipo del virus de la hepatitis C

El análisis filogenético de diferentes aislamientos del VHC nos indica la presencia de diferentes niveles de variabilidad genética como genotipos, subtipos y cuasiespecies. En función de su heterogeneidad genética, el VHC tiene 6 genotipos y por lo menos 80 subtipos (Davis GL. 1999). Los genotipos se pueden determinar mediante métodos serológicos y moleculares. Los métodos moleculares están basados en las diferencias de nucleótidos en la región altamente conservada 5' UTR entre los genotipos. Existen diferentes métodos comerciales que permiten determinar los genotipos. Versant HCV Genotype Assay (LIPA, Bayer Diagnostics) es un análisis en el cual los amplicones obtenidos hibridan con las sondas encajadas en una matriz de nitrocelulosa (Stuyver L y cols. 1993). Otro método basado en hibridación inversa es el INNO-LIPA HCV II (Innogenetics), probablemente el más extendido en los laboratorios clínicos.

Los métodos serológicos se basan en la detección de anticuerpos frente a epítomos genotipo-específicos en la región de NS4 y del core. Son más fáciles de realizar y más

económicos que las técnicas moleculares, aunque tienen una sensibilidad y especificidad inferior (Lee JH y cols. 1997).

Entre el 1 y el 4% de los pacientes presentan más de un genotipo (Strader DB y cols. 2004).

- Uso clínico de las pruebas moleculares

Los análisis cualitativos de detección del ARN-VHC se utilizan tanto para el diagnóstico de la infección como para evaluar la eficacia del tratamiento. Ello se debe a que estos métodos son más sensibles y detectan menores niveles de ARN-VHC (50 UI/mL) que los ensayos cuantitativos (**tabla 5**) (Salvadó M. 2005).

Tabla 5: Métodos moleculares disponibles para el diagnóstico

Test	Método	Fabricante	Límite detección (UI/mL)	Rango dinámico (UI/mL)
Cualitativos				
AMPLICOR HCV v.2.0	RT-PCR, manual	ROCHE	50	
COBAS AMPLICOR	RT-PCR, semiautomático	ROCHE	50	
VERSANT HCV RNA	TMA	BAYER	10	
Cuantitativos				
COBAS AMPLICOR HCV MONITOR v.2.0	RT-PCR semiautomático	ROCHE		600-850.000
VERSANT HCV RNA v.3.0	bADN	BAYER		615-8.000.000
COBAS TaqMan HCV	RT-PCR en tiempo real	ROCHE		30-200.000.000
LCx™ HCV RNA	RT-PCR	ABBOTT		23-2.630.000
PCR en tiempo real HCV ensayo cuantitativo	RT-PCR a tiempo real	ABBOTT		50-100.000.000
SuperQuant	RT-PCR	National Genetics Institute		30-1.470.000

Salvadó M. Uso clínico de las pruebas de laboratorio disponibles para el diagnóstico de la hepatitis C. *Hepatología hoy* 2005;1:129-137

Debe realizarse una determinación cualitativa del ARN-VHC en los pacientes en tratamiento. La negatividad del ARN-VHC en la semana 12 del tratamiento se acompaña de una alta probabilidad de alcanzar la curación en los pacientes con genotipo 1. Por el contrario, su positividad indica la ineficacia del tratamiento y justifica su interrupción si el descenso de la carga viral es inferior a 2Log_{10} (Lee SS y cols. 2002, Fried MW y cols. 2002). Cuando este descenso es superior, pero no existe negativización del ARN, las posibilidades de curación (respuesta viral sostenida) son reducidas, pero las guías actuales permiten mantener el tratamiento (Ladero JM y cols. 2008).

Los ensayos cuantitativos se usan tanto antes del tratamiento (ARN-VHC basal) como en la valoración precoz de la respuesta. La constatación de una carga viral basal menor de 800.000 UI/mL constituye un factor predictivo positivo de respuesta al tratamiento en todos los genotipos (McHutchinson JG y cols. 1998, Poynard T y cols. 1998). Recientemente se ha sugerido que el límite de 400.000 UI/mL es más discriminativo (Witthöft T y cols. 2007). Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre en la infección por VIH, la cantidad de viriones del VHC no influye en la progresión de la hepatitis C y no está asociada con la gravedad de la enfermedad hepática (Barbeau JM y cols. 2004).

6. Anatomía patológica

La biopsia hepática es un importante método diagnóstico en la evaluación de pacientes con hepatitis crónica por virus C. Es esencial para establecer con certeza el diagnóstico de hepatitis crónica o cirrosis, distinguirla de otras hepatopatías crónicas o posibles procesos concomitantes, definir el grado de actividad de la enfermedad y su estadio evolutivo, evaluar los posibles efectos del tratamiento antivírico así como investigar posibles factores etiológicos o patogénicos de la enfermedad (Dienstag JL. 2002) (**tabla 6**). Sin embargo, el papel de la biopsia hepática en el manejo de los pacientes con hepatitis crónica C está siendo reexaminado en la actualidad. En la última Conferencia de Consenso Americana del

2002 se considera que ésta no es imprescindible en los pacientes infectados por los genotipos 2 y 3, en los que la tasa de respuesta virológica sostenida es del 70-80% (Gebo KA y cols. 2002, Seeff LB y Hoofnagle JH. 2002). Además, la biopsia hepática presenta también limitaciones e inconvenientes, ya que se trata de un procedimiento cruento no exento de complicaciones, la muestra puede ser insuficiente para la interpretación histológica, y está sujeta a variabilidad o error intraobservador e interobservador.

El espectro de hallazgos histológicos en pacientes con infección crónica por VHC es amplio y comprende desde la inflamación linfocítica periportal mínima hasta la hepatitis activa con puentes de fibrosis, necrosis hepatocitaria y cirrosis evidente. Para cuantificar el grado de lesión hepática en los pacientes con hepatitis crónica C se emplean distintos índices, entre ellos se encuentra el Índice de Knodell, también denominado Índice de Actividad Histológica (HAI), en el cual se valoran cuatro aspectos: la necrosis periportal, la necrosis intralobulillar, la inflamación portal y la fibrosis, que es el que se utiliza en nuestro centro para valorar el grado de inflamación y el estadio de fibrosis (**tabla 7**) (Knodell RG y cols. 1981). Existen otros índices histológicos como los de Ishak, METAVIR y Scheuer (Scheuer PJ. 1991, Ishak K y cols. 1995, Goodman ZD e Ishak KG. 1995, Bedossa P y Poynard T. 1996). Aunque las inferencias pronósticas de los hallazgos histológicos específicos no están claras, la inflamación leve y la fibrosis escasa se asocian a bajo riesgo de progresión a cirrosis, mientras que los pacientes con actividad necroinflamatoria grave o fibrosis avanzada evolucionen a cirrosis con el tiempo.

Tabla 6: Objetivos de la biopsia hepática en la hepatitis crónica C

1. Establecer el diagnóstico de hepatitis crónica o de cirrosis
2. Evaluar posibles procesos concomitantes y excluir otras enfermedades hepáticas
3. Definir la actividad necroinflamatoria (grado)
4. Analizar el pronóstico según la intensidad de la fibrosis (estadio)
5. Predecir y evaluar la respuesta terapéutica
6. Conocer el proceso evolutivo de la afectación hepática
7. Investigar posibles aspectos etiológicos y patogénicos

Tabla 7: Índice de actividad histológica (Histology Activity Index) o índice de Knodell

Necrosis periportal ± en puentes	Puntos	Degeneración intralobular y necrosis focal	Puntos	Inflamación portal	Puntos	Fibrosis	Puntos
Ausente	0	Ausente	0	Ausente	0	Ausente	0
Leve necrosis “piecemeal”	1	Leve (cuerpos acidófilos, balonización y/o focos de necrosis en 1/3 de lóbulos)	1	Leve (células inflamatorias en <1/3 de los tractos portales)	1	Fibrosis portal	1
Moderada necrosis “piecemeal” (<50% circunferencia de los tractos portales)	3	Moderada (1/3-2/3 de lóbulos)	3	Moderada (1/3-2/3 tractos portales)	3	Fibrosis en puentes (porto-portal o porto- central)	3
Marcada necrosis “piecemeal” (>50% circunferencia)	4	Marcada (>2/3 lóbulos)	4	Marcada (>2/3 tractos portales)	4	Cirrosis	4
Moderada necrosis “piecemeal” más necrosis en puentes	5						
Marcada necrosis “piecemeal” y necrosis en puentes	6						
Necrosis multilobular	10						
		Total HAI (Índice de Knodell) = /22					

Adaptado de Knodell RG y cols. Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. Hepatology 1981;1:431-435

7. Tratamiento de la hepatitis crónica C

La infección por el VHC afecta aproximadamente al 3% de la población mundial y genera una importante morbilidad a largo plazo, siendo la primera causa de trasplante hepático en Europa y Estados Unidos (Seeff LB y Hoofnagle JH. 2002). Estos hechos determinan la necesidad de unas opciones terapéuticas eficaces que controlen, e incluso prevengan, esta infección. Para ello, es obligatorio establecer una serie de criterios

homogéneos a la hora de llevar a cabo este tratamiento. Así, desde 1997, se vienen realizando distintas Conferencias de Consenso, en las que se dictan pautas de tratamiento.

El objetivo del tratamiento antiviral en la hepatitis crónica C es conseguir la erradicación de la infección en las primeras fases de la enfermedad mediante la desaparición de la viremia, con el fin de prevenir las complicaciones de la infección por el VHC, es decir, el desarrollo de cirrosis hepática y de carcinoma hepatocelular.

Se han empleado criterios de valoración intermedios para evaluar el éxito de la respuesta que incluye la normalización de los niveles séricos de transaminasas, la desaparición del ARN de VHC en suero medido por varios métodos y la mejoría de los hallazgos histológicos. Un objetivo a largo plazo de la terapia es reducir la diseminación secundaria de la infección mediante la erradicación de la viremia.

El tratamiento actual de la hepatitis crónica C se basa en la combinación de interferón pegilado y ribavirina. (Hadziyannis SJ y cols. 2004, Zeuzem S y cols. 2004, McHutchison JG y cols. 2002, Sánchez-Tapias JM y cols. 2006, Fried MW y cols. 2002, Manns MP y cols. 2001).

7.1 Tipos de respuesta

Respuesta virológica precoz (RVP): negativización del ARN del VHC o descenso de al menos $\geq 2\log_{10}$ respecto al basal en la semana 12 de tratamiento.

Respuesta virológica rápida: negativización del ARN del VHC en la semana 4 del tratamiento.

Respuesta virológica lenta: ARN VHC positivo en la semana 4 y 12, y negativo en la semana 24.

Fracaso virológico primario: si el ARN del VHC no experimenta un descenso $\geq 2\log_{10}$ en la semana 12 de tratamiento o si es detectable a cualquier concentración en la semana 24 de tratamiento.

Respuesta virológica sostenida (RVS): negativización del ARN del VHC (menos de 50 UI/ml con el método Cobas Amplicor HCV v 2.0) en sangre periférica 6 meses (24 semanas) después de concluir el tratamiento (Seeff LB y Hoofnagle JH. 2002).

Respuesta bioquímica sostenida: persistencia de transaminasas normales 6 meses después de finalizado el tratamiento.

Recidiva virológica: Viremia indetectable durante el tratamiento, y reaparición antes de transcurridas 24 semanas de finalizado el mismo.

Recaída durante el tratamiento (*Breakthrough*): reaparición de viremia detectable antes de finalizar el tratamiento tras su negativización en algún momento del mismo.

Es de señalar que estos criterios son aplicables en su totalidad a los genotipos que deben recibir tratamiento durante 48 semanas (1 y 4 en nuestro medio). Los genotipos 2 y 3 se tratan durante 24 semanas y no está establecido por las guías clínicas que se deban realizar controles de viremia durante el tratamiento, ya que prácticamente todos los enfermos con estos genotipos la negativizan. Sí son de aplicación los criterios de respuesta virológica sostenida o de recidiva.

7.2 Fármacos disponibles

La combinación de interferón alfa (α) y ribavirina induce una importante inhibición de la replicación viral, dificulta la infección de nuevas células y estimula la respuesta inmune celular.

El **interferón α** es la piedra angular de las terapias antivirales actuales. Los interferones son proteínas naturales que tienen un amplio espectro de efectos: 1) efectos antivirales, mediante la inhibición de la replicación viral en las células infectadas; 2) secreción de citocinas; 3) efectos antiproliferativos, y 4) efecto inmunomodulador al estimular la respuesta antiviral específica del huésped (aumentando la producción de células

T helper tipo 1 y reduciendo la producción de células supresoras, Th 2), lo que acelera la muerte de las células infectadas (Sen GC y Ransohoff RM. 1993, Peters M. 1996, Tilg H. 1997).

Durante años el interferón administrado como monoterapia fue el tratamiento estándar en pacientes con hepatitis crónica C, con resultados modestos en el mejor de los casos. Posteriormente se han desarrollado nuevas formas de interferón, los interferones pegilados, interferón pegilado alfa-2a (Pegasys, Hoffmann-La Roche) e interferón pegilado alfa-2b (Peg-Intron, Schering-Plough), compuestos ambos por interferón unido a una molécula de polietilenglicol de longitud variable, que aumenta la vida media de la molécula y reduce el volumen de distribución, lo que permite una dosis semanal, aunque difieren en sus propiedades químicas y farmacocinéticas. Los interferones pegilados proporcionan niveles plasmáticos más uniformes y elevados, en contraposición con las fluctuaciones observadas con el interferón convencional. Los estudios realizados indican que obtienen con mayor frecuencia respuesta virológica sostenida, con similares efectos adversos.

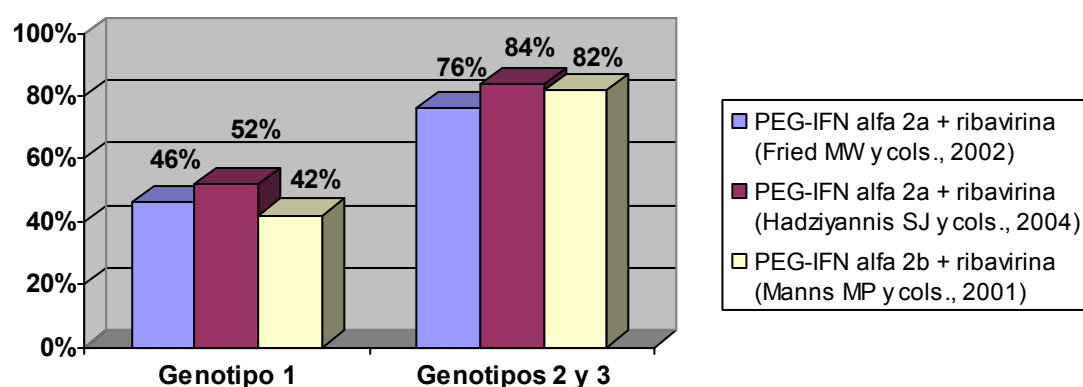
La **ribavirina** es un análogo sintético de la guanosina. Es un agente antiviral con actividad frente a los virus ADN y ARN; se administra por vía oral, tiene una vida media larga y presenta excreción renal. En monoterapia induce una reducción moderada (<0.5 log ARN VHC UI/mL) y transitoria de la carga viral en aproximadamente el 50% de los pacientes (Pawlotsky JM y cols. 2004). Además puede poseer cierto efecto inmunomodulador, como la propiedad de aumentar las células Th1 frente a las Th2 (Hultgren C y cols. 1998). En general es bien tolerada, aunque se puede observar hemólisis significativa. Es teratógena, por lo que se debe evitar el embarazo durante el tratamiento y hasta 6 meses después de haberlo suspendido.

7.3 Protocolo terapéutico actual

El tratamiento con interferón pegilado y ribavirina es más eficaz que la combinación de interferón estándar y ribavirina o el interferón pegilado solo. La tasa de respuesta virológica sostenida parece similar con ambas formas de interferón pegilado (alfa-2a y alfa-2b) en combinación con ribavirina. El aclaramiento viral se asocia con una mejoría histológica, una reducción a largo plazo de las complicaciones de la hepatitis crónica así como con una mejoría de la calidad de vida de los pacientes (Seeff LB y Hoofnagle JH. 2002).

Existen distintos factores que se asocian a una mayor probabilidad de respuesta al tratamiento, entre los que se incluyen los genotipos 2 y 3, una carga viral baja, un bajo grado de inflamación y fibrosis en la biopsia hepática, y un bajo índice de masa corporal (**tabla 8, figura 8**) (McHutchison JG y cols. 2000, Poynard T y cols. 2000, Bressler BL y cols. 2003, Tabone M y cols. 2002, Hadziyannis SJ y cols. 2004, Zeuzem S y cols. 2004, Fried MW y cols. 2002, Manns MP y cols. 2001).

Figura 8: Frecuencia de respuesta virológica sostenida tras tratamiento con interferón pegilado y ribavirina según el genotipo (tres estudios)



En el genotipo 1, se ha señalado que el tratamiento con 180 µg de interferón pegilado alfa 2a y ribavirina a dosis máximas (1.000-1.200 mg/d ajustada al peso) durante 48 semanas consigue una RVS del 52%, tasa que disminuye si se disminuye el tiempo o la dosis de ribavirina (Hadziyannis SJ y cols. 2004) lo que se ha corroborado posteriormente (Witthöft T y cols. 2007). Recientemente se ha comprobado en los pacientes con genotipo 1 sin respuesta virológica (ARN positivo) en la cuarta semana, que la prolongación del tratamiento combinado con interferón pegilado y ribavirina hasta 72 semanas puede aumentar la tasa de RVS de un 27% si son tratados 48 semanas frente al 44% si se tratan 72 semanas (McHutchison JG y cols. 2002). Esto ha sido confirmado con posterioridad por otros autores que no sólo observan una mayor tasa de respuesta sostenida en los pacientes con genotipo 1 tratados 72 semanas frente a los que son tratados 48 semanas sino que además observan una menor tasa de recaídas (Berg T y cols. 2006; Sánchez-Tapias JM y cols. 2006; Pearlman BL y cols. 2007). No obstante, estos resultados deben considerarse preliminares y no se han modificado aún las guías clínicas en vigor en función de los mismos. Probablemente lo sean en próximas conferencias de consenso, pero tras un análisis detenido, ya que las repercusiones económicas de la prolongación del tratamiento hasta 72 semanas son importantes (Poordad FF y cols. 2007)

El tratamiento debe interrumpirse si la viremia no ha disminuido $\geq 2\log_{10}$ en la semana 12 o si, logrado este objetivo, no es indetectable en la semana 24 (Seeff LB y Hoofnagle JH. 2002).

El genotipo 4 precisa también tratamiento durante 48 semanas y a dosis máximas, ajustadas al peso, de ribavirina para alcanzar una RVS del 79% (Hadziyannis SJ y cols. 2004). Por tanto, los pacientes con genotipo 4 se deberían tratar como los sujetos con genotipo 1. Sin embargo, en un estudio reciente la existencia de una carga viral baja, un menor estadio de fibrosis y una mayor tasa de RVS sugiere que los sujetos con genotipo 4 presentan un patrón de enfermedad menos agresivo que aquellos que presentan un genotipo 1 (Trapero-Marugán M y cols. 2007).

Los sujetos con genotipos 2 y 3 tratados con 180 µg de interferón pegilado alfa 2a y 800mg de ribavirina durante 24 semanas presentaban una RVS del 82%. No se ha comprobado que el aumento del tiempo de tratamiento o de la dosis de ribavirina en estos sujetos consiga incrementar la tasa de RVS (Hadziyannis SJ y cols. 2004) lo que se ha corroborado posteriormente (Witthöft T y cols. 2007). Sin embargo, este es un concepto en revisión y hay autores que consideran que entre los pacientes infectados por genotipo 3 hay un subgrupo con criterios de mala respuesta, especialmente la fibrosis avanzada (Aghemo A y cols. 2006) en los que cabría plantear la aplicación los esquemas terapéuticos del genotipo 1, en tanto que otros enfermos, especialmente los infectados por genotipo 2 y con criterios favorables de respuesta, podrían reducir la duración del tratamiento a 16 semanas sin mengua de la tasa de respuesta viral sostenida (Shiffman ML y cols. 2007).

7.4 Factores que influyen en la respuesta al tratamiento

La respuesta al tratamiento depende de factores relacionados con el tratamiento, con el paciente, con la enfermedad y con el propio virus. De tal manera que hay factores que condicionan claramente una RVS, mientras que otros indican todo lo contrario, es decir, la resistencia al tratamiento antiviral (**tabla 8**) (McHutchison JG y cols. 2000, Poynard T y cols. 2000, Bressler BL y cols. 2003, Tabone M y cols. 2002, Hadziyannis SJ y cols. 2004, Zeuzem S y cols. 2004). Por otro lado, la importancia de cada uno de estos factores es muy diferente: el más importante es el genotipo.

Tabla 8. Factores que influyen en la respuesta al tratamiento

Variables	Respuesta favorable	Respuesta desfavorable
Respuesta a un intento previo de tratamiento	Recidiva / Respuesta parcial	No respuesta
Raza	No Afroamericanos	Afroamericanos
Edad	Menor 40 años	Mayor 40 años
Peso	Normal	Obesidad
Sexo	Mujer	Hombre
Consumo de alcohol	Menos de 80g/día	Más de 80 g/día
Genotipo	Tipo 2 y 3	Tipo 1 y 4
Carga viral	Baja (<800.000 UI/ml)	Alta (>800.000 UI/ml)
Grado de fibrosis	Mínima	Cirrosis

7.5 Adherencia al tratamiento

Se ha demostrado que los pacientes que cumplen el tratamiento tienen más probabilidad de presentar una RVS. Existe una regla clásica llamada 80/80/80, para definir a los pacientes que reciben al menos el 80% de la dosis de IFN y el 80% de la dosis de ribavirina durante al menos el 80% del tiempo de tratamiento. Éstos son los pacientes con más posibilidades de responder (McHutchinson JG y cols. 2002).

7.6 Contraindicaciones y efectos adversos del tratamiento

Las contraindicaciones al tratamiento con interferón pegilado y ribavirina se resumen en la **tabla 9**.

Tabla 9: Contraindicaciones del tratamiento con interferón pegilado y ribavirina

Contraindicaciones	
Interferón pegilado	Abuso de sustancias (particularmente alcohol) Trastornos autoinmunes Cirrosis hepática descompensada Hipertiroidismo Neutropenia Embarazo, lactancia Trastornos psiquiátricos Trombocitopenia Diabetes mellitus no controlada Hipertensión arterial no controlada Epilepsia y/o afectación de la función del SNC Fallo renal crónico o aclaramiento de creatinina <50ml/min
Ribavirina	Anemia Enfermedad cerebrovascular Enfermedad coronaria Enfermedad renal en estadio terminal Hemoglobinopatías Embarazo

Adaptado de Lauer GM y Walker BD. Hepatitis C virus infection. N Engl J Med 2001;345:41-52.

El 10-14% de los sujetos tratados con interferón pegilado y ribavirina muestran efectos secundarios que hacen necesaria la interrupción del tratamiento según los distintos ensayos clínicos (Seeff LB y Hoofnagle JH. 2002).

Los efectos adversos más frecuentes del tratamiento combinado incluyen síntomas gripales, alteraciones hematológicas (citopenias) y síntomas neuropsiquiátricos (sobre todo depresión).

Las citopenias, en ocasiones, hacen necesarias la reducción de dosis y el tratamiento con factores estimulantes hematopoyéticos con el fin de disminuir los síntomas y así poder continuar con el tratamiento antiviral. En sujetos con insuficiencia renal pueden observarse hemólisis severas debidas al tratamiento con ribavirina por lo que estos sujetos deben recibir monoterapia con interferón pegilado (Sporea I y cols. 2006).

En el caso de la depresión, ésta en ocasiones requiere tratamiento antidepresivo, especialmente inhibidores de la recaptación de la serotonina, con el fin de controlar y reducir los síntomas de la misma.

Otros efectos secundarios que pueden obligar a la interrupción del tratamiento con reacciones cutáneas extensas y graves e hipertiroidismo. El hipotiroidismo no es excepcional durante el tratamiento, pero no obliga a su suspensión ya que se controla con administración de hormona tiroidea. Sin embargo, suele ser permanente.

8. Células del sistema inmune

8.1 Linfocitos

Los linfocitos se desarrollan a partir de progenitores linfoides inmaduros derivados de la célula hematopoyética primordial pluripotente y se dividen en dos linajes, linfocitos B y linfocitos T, según que estos progenitores linfoides maduren en los propios sitios hematopoyéticos o en el timo, respectivamente.

Los linfocitos B aparecen a partir de la 8ª semana de gestación en el hígado, epiplón y esplacnopleura fetal, y más tarde, en la médula ósea, siendo el único sitio hematopoyético y de linfopoyesis B tras el nacimiento. Los linfocitos B están especializados en la producción de anticuerpos e inmunoglobulinas y son los responsables de la respuesta inmune humoral, de anticuerpos, frente a un estímulo antigénico.

Los linfocitos T se encuentran en el timo, órgano bilobulado de localización mediastínica que deriva de un esbozo epitelial formado a partir de la tercera bolsa faríngea.

Está organizado en lobulillos en los que se distingue una zona externa o corteza y otra interna o médula. En la corteza se encuentran la mayoría (85-90%) de los timocitos o linfocitos T inmaduros, así como algunos macrófagos. En la médula, el número de timocitos es menor y la mayoría son linfocitos T maduros; también existen macrófagos así como estructuras concéntricas de macrófagos y células epiteliales, los corpúsculos de Hassal. En la unión corticomedular existen células dendríticas interdigitadas derivadas de la médula ósea. Los linfocitos T son los responsables de la respuesta inmune celular, mediada por células, como son el rechazo de injertos, la reacción injerto contra huésped, la citotoxicidad contra células infectadas por virus, y las reacciones cutáneas de hipersensibilidad retardada, así como de complejas funciones de cooperación para que se desarrollen todas las formas de respuesta inmune, que incluye la respuesta de anticuerpos por los linfocitos B.

El fenómeno primario y esencial de toda respuesta inmune es el reconocimiento del antígeno por los linfocitos T y B. Esto se consigue gracias a la existencia en la membrana linfocitaria de receptores específicos para el antígeno; las inmunoglobulinas en el caso de los linfocitos B y el receptor de los linfocitos T, también denominado RCT en el caso de los linfocitos T (Farreras P y Rozman C. Medicina Interna 14ª Ed., vol. II, págs 3062-3076. Harcourt Ediciones).

a) Linfocitos T

Especialización funcional de las subpoblaciones de linfocitos T

- *Células con actividad cooperadora*

Las células cooperadoras (*T helper* o *Th*) son una subpoblación de linfocitos T que participan en la activación y diferenciación de las células B y de linfocitos T citotóxicos CD8⁺.

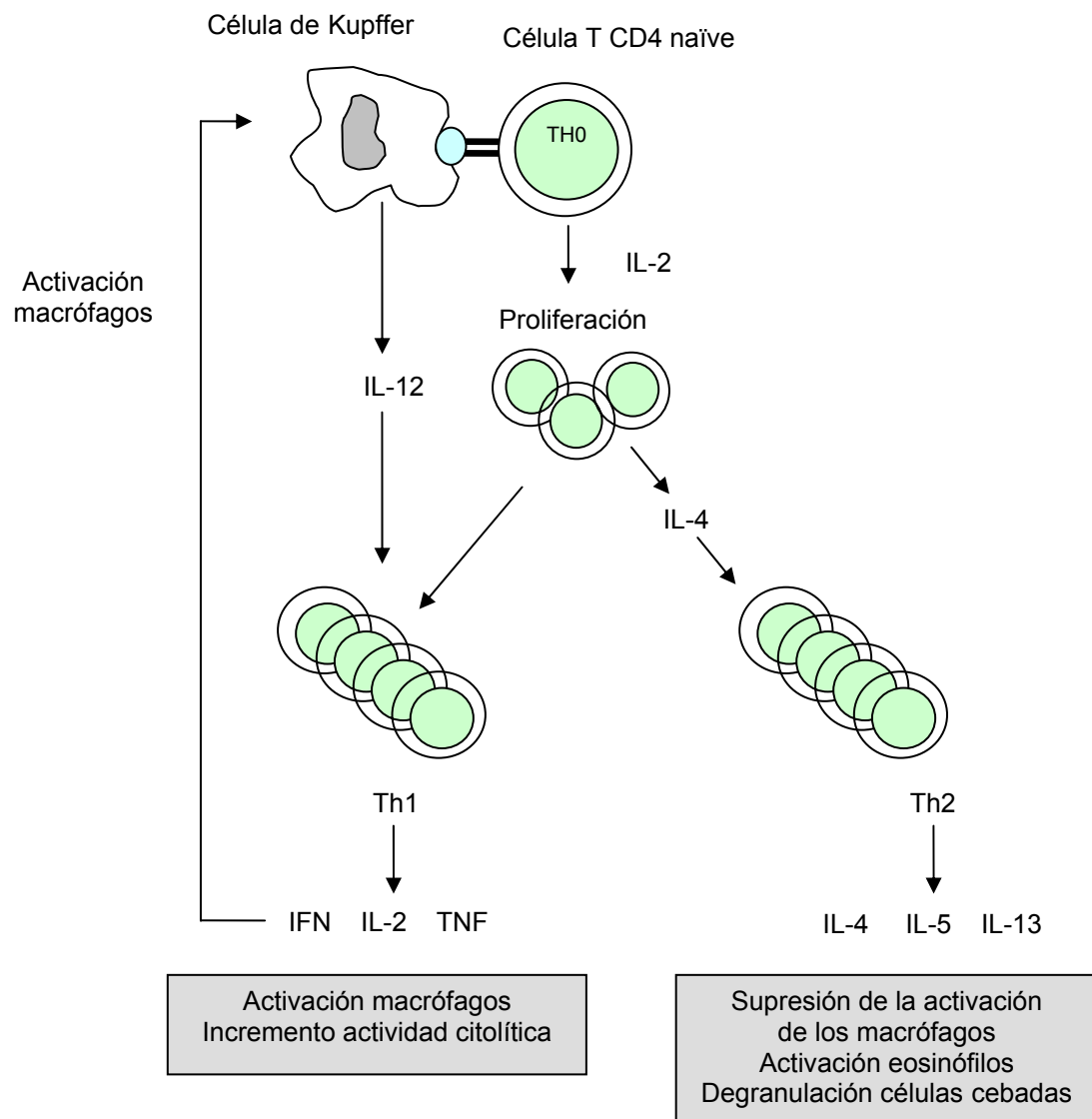
La actividad Th está desempeñada por la subpoblación CD4⁺ y en el proceso intervienen tanto la interacción directa entre determinados receptores/ligandos de la superficie de las células T y B, como la secreción de mediadores solubles (*citocinas*).

Las células precursoras (*Th0*) activadas, es decir, tras reconocer el antígeno, se subdividen en dos grandes subpoblaciones de células T helper (*Th1* y *Th2*); esta diferenciación depende tanto de las citocinas existentes en el medio como del patrón de secreción de citocinas. La presencia de IL-12 (secretada por los macrófagos y células NK), IFN γ y TGF β dará lugar a una respuesta Th1, importante en la respuesta inmune celular antígeno-específica y en la defensa frente a patógenos intracelulares como los virus, así como en la activación de células NK y generación de linfocitos T citotóxicos. La presencia de IL-4, producida por mastocitos y células NK 1.1 propias del hígado, e IL-10 promueve la diferenciación a linfocitos Th2 responsables de la respuesta inmune humoral y de la defensa frente a helmintos así como de la inhibición de la respuesta Th1.

Los linfocitos Th1 secretan preferentemente IL-12, IL-2, IFN γ y TGF β , mientras que los linfocitos Th2 secretan IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13; otras citocinas (ej. TNF α) son producidas indistintamente por ambas subpoblaciones.

Existe una regulación recíproca entre ambos tipos de linfocitos, ya que la IL-4 interfiere con la activación y secreción de IFN γ por las células Th1 y el IFN γ inhibe la producción de IL-4 por las Th2. El predominio de la actividad de una u otra subpoblación condiciona el tipo de respuesta efectora frente a un determinado estímulo antigénico (O'Garra A. 1998, Morel PA y Oriss TB. 1998, Dong C y Flavell RA. 2001) (**figura 9**).

Ejemplo: El IFN γ , potente activador de la función de los macrófagos, constituye un mediador fundamental en las respuestas a patógenos intracelulares, así como en las reacciones de hipersensibilidad retardada. Por su parte, la respuesta Th2 actúa frente a ciertos parásitos (helmintos) y reacciones de hipersensibilidad inmediata.

Figura 9: Diferenciación a linfocitos Th1 y Th2

Los linfocitos $CD4^+$ maduros pueden dividirse en dos grandes grupos según la expresión mutuamente excluyente de las isoformas $CD45RA^+$ y $CD45RO^+$ de la molécula $CD45$ (*antígeno leucocitario común*).

- $CD45RA^+RO^-$ o $CD4^+$ naíve, son células vírgenes, es decir, células que previamente no han sido estimuladas por el antígeno.

- $CD45RO^+RA^-$, son linfocitos T activados que permanecen quiescentes tras la desaparición del estímulo (*células de memoria*). Éstas juegan un papel importante en la respuesta secundaria que se desarrolla ante una nueva exposición al mismo antígeno.

- *Células con actividad citotóxica*

La citotoxicidad celular es la propiedad que tienen algunos leucocitos de interaccionar con otras células y destruirlas. Este grupo está constituido principalmente por linfocitos T $CD8^+$ y algunos $CD4^+$, así como por las células natural killer (*NK*). Este mecanismo de respuesta puede intervenir en la defensa frente a infecciones víricas y células neoplásicas, así como en la destrucción de células trasplantadas.

Los linfocitos T citotóxicos (*LTC*) reconocen a las células diana a través del receptor del linfocito T (*RCT*), con la participación secundaria de otras interacciones moleculares. Los linfocitos T citotóxicos también secretan citocinas, especialmente $IFN\gamma$ y $TNF\alpha$ (Carbone FR y cols. 1998).

b) Linfocitos B

Los linfocitos B son las células responsables de la producción de anticuerpos tras un estímulo antigénico.

Si el antígeno es presentado en condiciones apropiadas, es decir, con la cooperación de los linfocitos T $CD4^+$, a los linfocitos B, se produce activación y proliferación de los mismos, esto es, aumento por división celular del número de linfocitos B específicos del antígeno en cuestión. Una parte de estas células se diferencian o maduran hasta *células secretoras de anticuerpos*, que secretan en grandes cantidades de IgM que antes expresaban en su membrana, y otra parte pasa a un estado de linfocitos B quiescentes y recirculantes que constituyen las *células B de memoria*. Estos fenómenos ocurren en los órganos linfoides secundarios. Las células B de memoria se generan en los centros germinales de los folículos linfoides. Si bien las células secretoras de anticuerpos se generan en los órganos linfoides secundarios, migran hacia la médula ósea donde maduran

dando lugar a las células plasmáticas. Las células B de memoria son los precursores inmediatos de las células secretoras de anticuerpos y cambian su expresión de inmunoglobulina, expresando ahora IgG, IgA, IgE o combinaciones de éstas.

8.2 Células presentadoras de antígenos (CPA)

Las células dendríticas residen en sitios de interacción entre el individuo y el ambiente como la piel y las superficies mucosas, así como en la sangre (circulantes). El continuo *turnover* entre estos tejidos y los órganos linfoides secundarios permite a las células luchar de forma precoz frente a patógenos en el curso de una infección (Guermonprez P y cols. 2002). Tras un estímulo inflamatorio se producen una serie de cambios en la fisiología de las células dendríticas denominada maduración. Este proceso resulta de la interacción de los ligandos estimuladores (ej. lipopolisacáridos, CD40L, ARN de doble cadena, $TNF\alpha$) con receptores específicos en las células dendríticas (ej. receptores *Toll-like*, receptor $TNF\alpha$) (Caux C y cols. 1994, Schuurhuis DH y cols. 2000, Visintin A y cols. 2001). El proceso de maduración comienza en la periferia y continúa en su migración a los órganos linfoides secundarios, donde las células dendríticas expresan gran cantidad de MHC de clase I y II en su superficie así como moléculas de adhesión (CD80 y CD86) (Cella M y cols. 1997, Albert ML y cols. 1998). Estas moléculas juegan un papel fundamental en la estimulación de células T $CD4^+$ y $CD8^+$, por tanto las CPA son necesarias para el reconocimiento específico del antígeno por los linfocitos T y/o B que se activan tras el contacto con éste (fase inductora de la respuesta inmune) y/o para que los linfocitos específicos de antígeno o sus productos específicos (anticuerpos) o no específicos (citocinas) puedan desencadenar funciones biológicas que permitan erradicar o actuar sobre al antígeno o el territorio hístico sobre el que se halla en antígeno (fase efectora de la respuesta inmune).

Las células que participan en la fase efectora incluyen todas las células fagocíticas y todos los leucocitos que participan en las respuestas inflamatorias (monocitos-macrófagos, polimorfonucleares, eosinófilos, basófilos y mastocitos).

Los linfocitos T reconocen péptidos (6-12 aminoácidos) derivados del antígeno y presentados en la membrana de otras células unidos a las moléculas MHC de clase I (linfocitos T CD8⁺) o de clase II (linfocitos T CD4⁺). La presentación vía MHC-I o MHC-II no depende de la naturaleza del antígeno, sino del modo en que éste accede al interior de las CPA, lo que a su vez determina como éstas lo procesan y lo degradan en péptidos.

La presentación vía MHC-clase I a los linfocitos T CD8⁺ citotóxicos requiere que el antígeno sea degradado en el citosol y que llegue al retículo endoplásmico. Esto ocurre cuando se trata de un antígeno sintetizado en la célula, por ejemplo, virus, implicando que la propia CPA debe estar infectada para que pueda inducir una respuesta de los linfocitos T citotóxicos contra el virus.

La presentación vía MHC-clase II a los linfocitos T CD4⁺ ocurre cuando el antígeno es extracelular y es interiorizado por la CPA (vía endocitosis, macropinocitosis o fagocitosis) y luego degradado en las vesículas endocítico-lisosómicas. Las CPA que presentan los antígenos extracelulares vía MHC-clase II a los linfocitos T CD4⁺ cooperadores son las células dendríticas, los monocitos-macrófagos y los linfocitos B activados.

Para que las CPA sean plenamente efectivas para estimular a los linfocitos T naïve necesitan presentar el antígeno en asociación con las moléculas MHC así como suministrar señales co-estimuladoras a los linfocitos T naïve, éstas son de dos tipos:

- a) producción de citocinas (IL-1, IL-6, TNF α , IL-12) que contribuyen a estimular a los linfocitos T.
- b) expresión en su membrana de ligandos o contrarreceptores que facilitan los contactos adhesivos entre las CPA y los linfocitos T.

Las células dendríticas pueden presentar, vía MHC-clase I, a virus inactivados capturados desde el exterior de forma tan eficiente como si estuvieran infectadas; esta

presentación, también llamada “cross-presentation”, puede también efectuarse por la fagocitosis de células apoptóticas infectadas.

Análogamente, cuando un monocito-macrófago captura un antígeno en forma particulada por fagocitosis, además de presentarlo vía MHC-clase II a los linfocitos T CD4⁺ cooperadores, también puede hacerlo vía MHC-clase I a los linfocitos T CD8⁺ citotóxicos.

8.3 Células citotóxicas naturales (NK)

Las células NK constituyen un 10-20% de los linfocitos de sangre periférica y la población mayoritaria de leucocitos endometriales durante la primera etapa de la gestación. Estos linfocitos pueden destruir diferentes tipos de células, tanto patológicas (infectadas por virus o tumorales) como normales (alogénicas y xenogénicas).

Las células NK ejercen su actividad espontáneamente, sin necesidad de una fase de inmunización previa, si bien determinadas citocinas como la IL-2, IL-12 y los IFNs amplifican sus mecanismos efectores.

La citotoxicidad puede desencadenarse en condiciones patológicas contra células que han perdido total o parcialmente la expresión de moléculas de MHC de clase I (ej. infectadas por virus, tumorales) o bien cuando las células NK carecen de receptores adecuados para reconocer las moléculas de clase I de la diana.

9. Respuesta inmune frente a virus

Una respuesta efectiva del huésped frente a la infección viral requiere la existencia de una respuesta inmune tanto específica como no específica frente al antígeno.

9.1 Respuesta inmune innata

Inmediatamente después de la infección viral se ponen en marcha múltiples mecanismos no antígeno-específicos cuyo resultado es el desarrollo de una respuesta inflamatoria que da lugar a la eliminación del patógeno. Los principales efectores de la

respuesta innata son las células natural killer (NK), los neutrófilos, las células dendríticas, el sistema del complemento así como citocinas y quimiocinas.

En este tipo de respuesta inmune se produce:

a) *Reclutamiento de leucocitos al sitio de la infección.* Efecto biológico llevado a cabo principalmente por citocinas proinflamatorias como el $\text{TNF}\alpha$ (Locksley RM y cols. 2001) e IL-1 (Dinarello CA. 1998) que: 1) inducen la expresión de moléculas de adhesión endotelial que captan leucocitos (Meager A. 1999). Las más importantes son ICAM-1 (CD54), VCAM-1 (CD106), endotelina P y E selectina; 2) estimulan la síntesis de quimiocinas por los macrófagos y células endoteliales que median el reclutamiento de leucocitos al foco de inflamación (Luster AD. 1998).

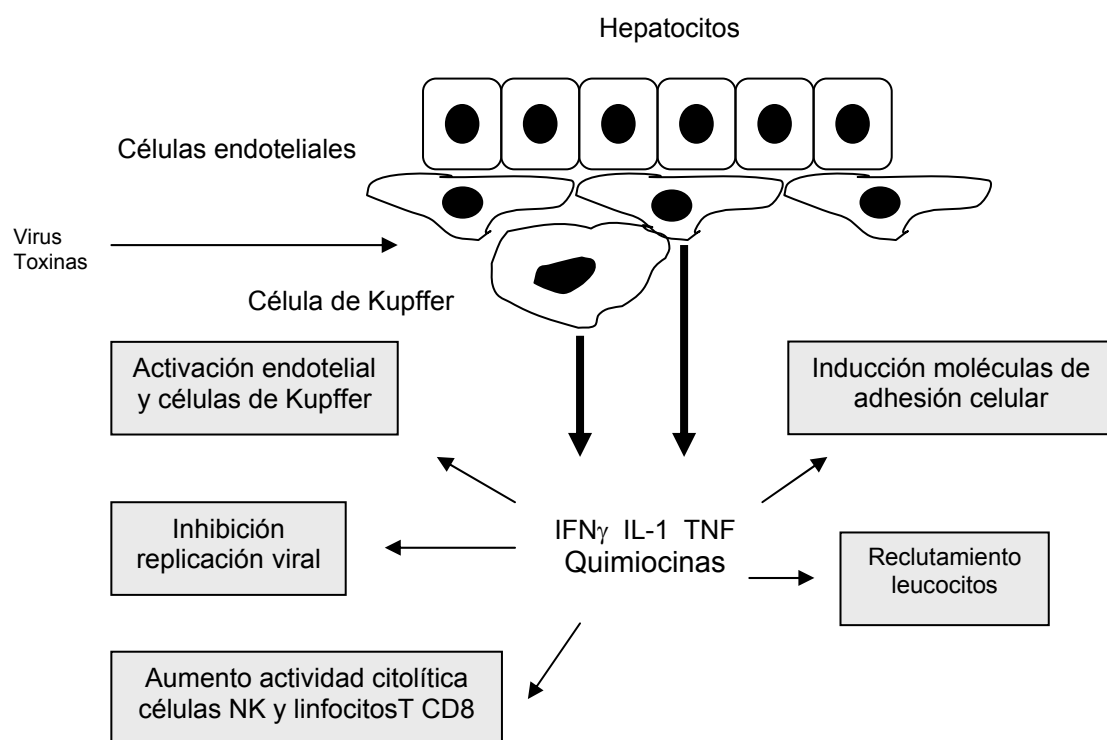
b) *Activación de los macrófagos e incremento de la actividad microbicida.* Aquí están implicadas distintas citocinas. El $\text{IFN}\gamma$ es la principal citocina bactericida, dado que junto a los polisacáridos bacterianos induce la producción macrofágica de $\text{TNF}\alpha$, lo que activa a los macrófagos y facilita la eliminación del patógeno (Aderem A y Underhill DM. 1999). Un modo indirecto de activar el macrófago es a través de la IL-12 que induce la producción de $\text{IFN}\gamma$ por las células NK y los linfocitos T (Gately MK y cols. 1998).

c) *Aumento de la función citolítica de las células NK y linfocitos T CD8^+ .* Este efecto es mediado principalmente por interferones (IFNs) e IL-12 (Gately MK y cols. 1998). Tanto el $\text{IFN}\alpha$ como el $\text{IFN}\gamma$ aumentan la expresión de moléculas clase I y II del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), lo que facilita el reconocimiento de antígenos asociados al MHC por los linfocitos T citotóxicos (LTC). Este efecto puede ser considerado como parte de la inmunidad adaptativa mediada por células.

d) *Inhibición de la replicación viral.* Es llevada a cabo fundamentalmente por los IFNs tipo 1 ($\text{IFN}\alpha$, $\text{IFN}\beta$ e $\text{IFN}\Omega$), ya que inducen la síntesis de enzimas que bloquean la replicación viral

e) *Inhibición de la activación de los macrófagos.* Las principales citocinas que regulan la respuesta innata son la IL-10 y el TGF β (Moore KW y cols. 2001, Blobe GC y cols. 2000), que inhiben la producción de TNF α e IL-12 por los macrófagos así como la expresión de moléculas MCH de clase II en los mismos. Por este último mecanismo, la IL-10 y el TGF β previenen la activación de las células T. Además el TGF β también inhibe la proliferación y diferenciación de las células T.

Figura 10: Citocinas y mecanismos efectores inmunidad innata



9.2 Respuesta inmune específica

Supone un mecanismo defensivo más avanzado (2ª línea de defensa) y, al contrario que la respuesta innata, es específica de cada patógeno. Incluye una respuesta humoral y celular en la que participan los linfocitos B, linfocitos T y CPA.

Una vez que se produce la infección viral, las CPA (sobre todo las células dendríticas) presentan en su superficie epítomos virales y se desplazan desde el lugar de la infección a los órganos linfoides primarios donde presentan estos antígenos virales a las células B y T naïve, que se convierten en linfocitos B y T específicos de patógeno. Los linfocitos B activados son los responsables de la inmunidad humoral y producen anticuerpos neutralizantes capaces de unirse a las partículas virales circulantes y así limitar su expansión, siendo éste un mecanismo clave en fases precoces de la infección. Posteriormente, una vez que el virus ha penetrado en el interior celular, el sistema inmune celular es el encargado de limitar la expansión del mismo, dificultando la expansión viral; este tipo de respuesta se realiza a través de la función citolítica de los linfocitos T CD8⁺ y helper de los CD4⁺.

Los antígenos virales son primero procesados y posteriormente presentados asociados a moléculas MHC de clase II a los linfocitos T CD4⁺ (Th) gracias a las células presentadoras de antígenos (CPA) (Germain RN y Margulies DH. 1993). Tras la activación antigénica las CPA secretan IL-1, IL-6 y TNF α , los cuales inducen expresión de receptores de IL-2 en las células T y secreción de otras citocinas que, a su vez, producen reclutamiento de otras células T con actividad efectora y reguladora. Al menos 2 señales son necesarias para la activación de las células Th: a) interacción entre el receptor de células T (RCT) y un complejo formado por MHC de clase II y antígenos virales, y b) la existencia de coestímulos moleculares (B7) o moléculas secretadas, como IL-1 (Krummel MF y Allison JP. 1995). Las células T helper CD4⁺ juegan un papel fundamental en la inmunorregulación de la infección por VHC a través de la modulación de la diferenciación de las células B y la activación de las células T citotóxicas CD8⁺.

La activación de las células B por los linfocitos Th da lugar a la producción y secreción de anticuerpos neutralizantes capaces de unirse a las partículas virales circulantes y así limitar la expansión viral mientras que los linfocitos T citotóxicos CD8⁺ (LTCs) ejercen su acción antiviral a través de la producción de citocinas y de mecanismos

citolíticos directos que inducen la necrosis y la apoptosis celular de las células infectadas que presentan péptidos virales asociados a moléculas HLA de clase I (Liaw YF y cols. 1995). La histólisis directa se lleva a cabo mediante la liberación de gránulos citolíticos (como las perforinas y granocinas) que interactúan y destruyen la membrana de la célula infectada. Además los linfocitos T CD8⁺ secretan citocinas de tipo 1 como el IFN γ y el TNF α que participan activamente en la inmunidad innata y adquirida.

Un aspecto clave es que los linfocitos T CD8⁺ requieren de la ayuda de los linfocitos T CD4⁺ para completar su diferenciación y así poder ejercer correctamente sus funciones. Por tanto, una respuesta vigorosa de los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ conseguirá eliminar el patógeno viral mientras que una respuesta débil contribuirá a la persistencia del virus en el huésped.

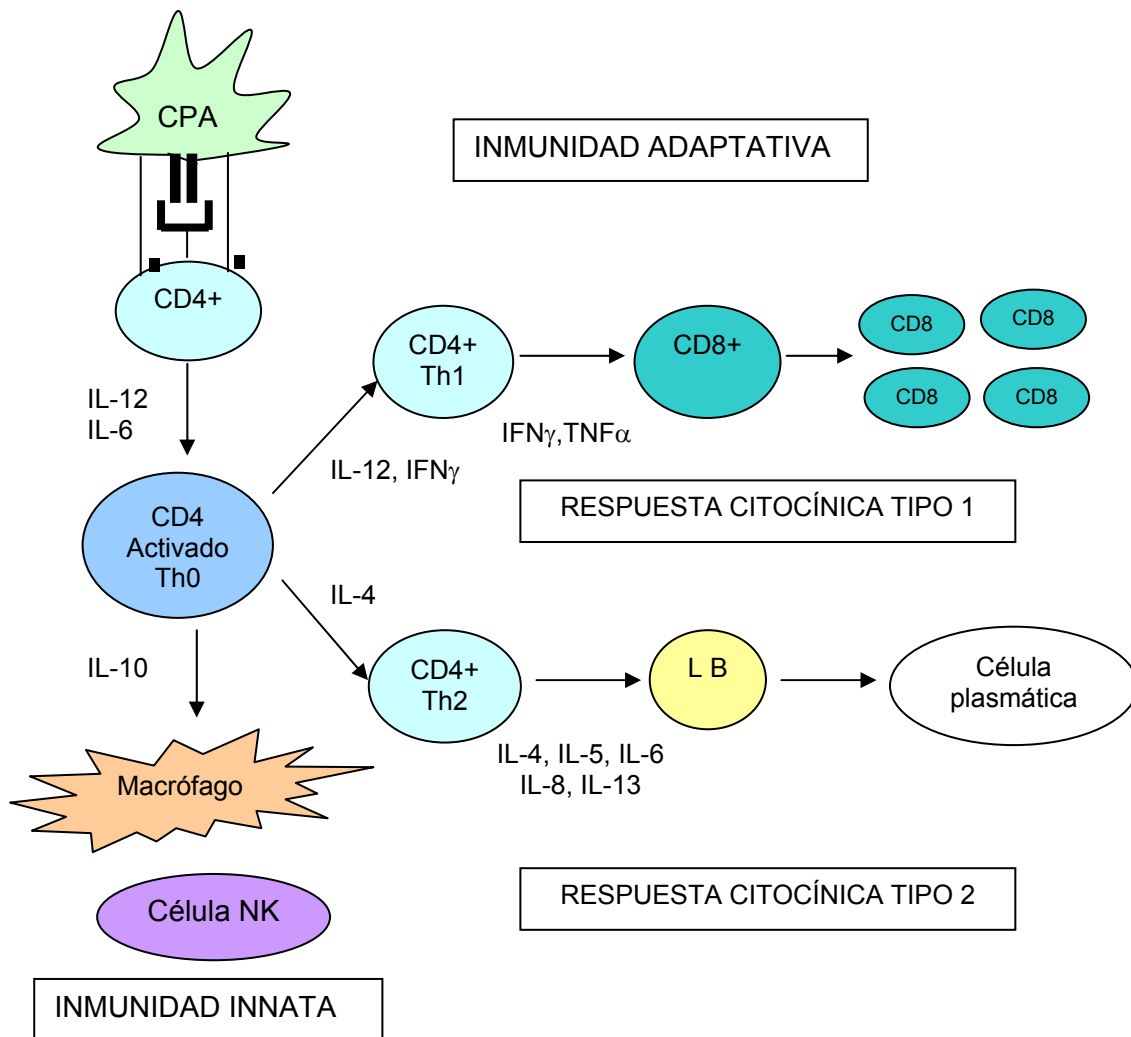
Las células precursoras (Th0) presentan la capacidad de producir tanto IL-4 como IFN γ . Las células CD4⁺ precursoras según el tipo de citocinas existentes en el medio pueden polarizarse en células T helper tipo 1 y tipo 2 (Th1 y Th2).

La presencia en el medio de IFN γ , IL-12 y TGF β , dará lugar a linfocitos Th1; éstos producen IL-2, IL-12, IFN γ , TGF β , importantes en la respuesta inmune celular antígeno-específica y en la defensa frente a patógenos intracelulares (ej. virus) así como en la activación de células NK y generación de linfocitos T citotóxicos.

La presencia de IL-4 e IL-10 promueve la diferenciación en linfocitos Th2 productores de IL-4, IL-5, IL-6, IL-13 e IL-10, responsables de la respuesta inmune humoral, la defensa frente a helmintos así como de la inhibición de la respuesta Th1.

Las citocinas existentes en el medio son producidas por células no T, por ejemplo la IL-12 es producida por macrófagos y células NK mientras que la IL-4 la producen mastocitos y células propias del hígado como son las células NK 1.1.

Figura 11: Mecanismos de la respuesta inmune innata y adaptativa (humoral y celular). Respuestas citocínicas tipo 1 y tipo 2. CPA: célula presentadora de antígeno. LB: linfocito B. Célula NK: célula natural killer. Th: linfocito T helper



Las citocinas Th1, sobre todo el IFN γ , inhiben la diferenciación a linfocitos Th2, mientras que la IL-4, citocina Th2, inhibe la respuesta Th1 (O'Garra A. 1998, Dong C y Flavell RA. 2001).

10. Citocinas

10.1 Concepto y nomenclatura

Las citocinas son mediadores solubles de la inmunidad, inflamación, crecimiento celular, remodelación tisular y desarrollo embrionario. Son proteínas de bajo peso molecular producidas por múltiples células que ejercen sus acciones tras su unión a receptores específicos expresados en las células diana. La expresión de estos receptores esta modulada por las propias citocinas.

Las citocinas son pleomórficas y redundantes, es decir, una misma citocina puede ejercer múltiples efectos al actuar sobre distintas células y distintas citocinas pueden contribuir al desarrollo de una misma función al actuar sobre una misma célula.

Históricamente el nombre de las citocinas se basaba según la célula productora así los mediadores solubles sintetizados por leucocitos, monocitos y linfocitos se denominaban interleucina (IL), monocina y linfocina respectivamente pero esta nomenclatura no es correcta ya que se ha visto que existen IL secretadas por otras células que no son los leucocitos por lo que se acuñó finalmente el término **citocina**.

En estado de reposo, las células productoras de citocinas sintetizan cantidades insuficientes siendo necesaria su activación para que se produzcan las suficientes cantidades para ejercer sus efectos biológicos. Las citocinas pueden ejercer su efecto sobre la propia célula productora (autocrina), células próximas (paracrina) o a distancia (endocrina).

Las acciones de la citocinas se engloban dentro de un sistema o red funcional donde el efecto de una molécula esta regulado positiva o negativamente por otras moléculas del sistema.

Estas proteínas participan de forma decisiva en muchos procesos normales o patológicos, por ejemplo, en la generación de respuestas inmunológicas, desarrollo de reacciones inflamatorias, angiogénesis, remodelación tisular o transformación neoplásica de

las células. Para conocer si una determinada citocina desempeña algún papel en una determinada enfermedad es necesario examinar su concentración en la sangre así como en el lugar de la lesión.

Juegan un papel importante en la defensa contra la infección viral indirectamente a través de la determinación de patrones de respuesta del huésped y directamente mediante la inhibición de la replicación viral. También pueden producir daño hepático (Farreras P y Rozman C. Medicina Interna 14ª Ed., vol. II, págs. 3062-3076. Harcourt Ediciones).

10.2 Clasificación

Las citocinas se pueden clasificar según su estructura, fuente celular o función, aunque con limitaciones, ya que, son pleomórficas y redundantes.

Clasificación según su efecto biológico:

1. Citocinas implicadas en la inmunidad
 - a. Citocinas que median la inmunidad innata
 - b. Citocinas que median la inmunidad adquirida
2. Quimiocinas
3. Factores de crecimiento
4. Citocinas implicadas en la hematopoyesis

En nuestro caso comentaremos con mayor profundidad las citocinas implicadas en la inmunidad tanto innata como adquirida.

10.2.1 Citocinas que median la inmunidad innata

La inmunidad innata o natural (IN) es el mecanismo inmune inicial frente a agentes infecciosos y células tumorales con el fin de eliminar al patógeno. Los principales efectores de IN son los fagocitos (neutrófilos y monocitos) y las células NK. Las funciones de neutrófilos y monocitos incluyen la fagocitosis y muerte del patógeno así como la secreción

de citocinas mientras que las células NK son capaces de matar a las células infectadas y tumorales y secretar citocinas que activen a los macrófagos.

Las citocinas proinflamatorias $\text{TNF}\alpha$ e IL-1 son las responsables del reclutamiento de leucocitos en el sitio de la infección por dos mecanismos: 1) inducción de la expresión de moléculas de adhesión endotelial que captan leucocitos (ICAM-1, VCAM-1...) y 2) estimulación de la síntesis de quimiocinas por los macrófagos y células endoteliales (Locksley RM y cols. 2001, Dinarello CA. 1998, Meager A. 1999, Luster AD. 1998).

La IL-1 y la IL-6 son las principales inductoras de la síntesis de proteínas de fase aguda por hepatocitos, y contribuyen a los efectos sistémicos de la inmunidad innata (Ramadori G y Christ B. 1999).

El $\text{TNF}\alpha$, a la vez que induce la expresión de moléculas de adhesión endotelial, estimula la producción de IL-8 por las células endoteliales, favoreciendo la extravasación de linfocitos, neutrófilos y monocitos. Además, activa a los macrófagos y facilita la eliminación del patógeno (Aderem A y Underhill DM. 1999).

El $\text{IFN}\gamma$ además de participar en el reclutamiento de leucocitos en el foco de la infección, es la principal citocina bactericida, potencia las acciones del $\text{TNF}\alpha$ y aumenta la expresión de moléculas MHC de clase I y II, lo que facilita el reconocimiento de antígenos asociados a MHC por los linfocitos T citotóxicos (LTC), aumentando así la capacidad citolítica de las células NK y linfocitos T CD8^+ (Aderem A y Underhill DM. 1999, Gately MK y cols. 1998).

La IL-12 activa a los macrófagos de modo indirecto, pues induce la producción de $\text{IFN}\gamma$ por las células NK y linfocitos T, lo que da lugar a un aumento de actividad microbicida de los mismos (Aderem A y Underhill DM. 1999). Además, al igual que el $\text{IFN}\gamma$, aumenta la capacidad citolítica de las células NK y linfocitos T CD8^+ al aumentar la expresión de moléculas MHC tanto de clase I como II (Gately MK y cols. 1998).

Por otro lado, existen dos citocinas que controlan las reacciones innatas mediante la inhibición de los macrófagos como son IL-10 y el TGF β . Éstos ejercen su efecto al inhibir la producción de TNF α e IL-12 por los macrófagos e inhibir la expresión de moléculas MHC de clase II en los mismos, lo que previene la activación de las células T. Además el TGF β también inhibe la proliferación y diferenciación de las células T (Moore KW y cols. 2001, Blobe GC y cols. 2000).

Los interferones, sobre todo los IFNs tipo 1 (IFN α e IFN β) inhiben la replicación viral.

10.2.2 Citocinas que regulan la inmunidad adquirida

La inmunidad adquirida es la 2ª línea de defensa frente a patógenos. Su inducción requiere el reconocimiento del antígeno por los linfocitos T y B. La inmunidad celular mediada por células T se realiza a través de la función citolítica de los linfocitos CD8⁺ y linfocitos T CD4⁺ o *helper* mientras que la inmunidad humoral es mediada por linfocitos B productores de anticuerpos.

Los linfocitos CD4⁺ colaboradores o *helper* producen citocinas necesarias para llevar a cabo actividad citolítica de los linfocitos CD8⁺ y síntesis de inmunoglobulinas por las células B.

Como consecuencia de la estimulación antígeno-específica, los linfocitos CD4⁺ pueden diferenciarse a linfocitos Th1 y Th2 (Blobe GC y cols. 2000, O'Garra A. 1998).

Los linfocitos Th1 son eficaces en la lucha antivírica y en la eliminación de patógenos de crecimiento intracelular.

Los Th2 activan mecanismos de inmunidad humoral, intervienen en las respuestas alérgicas y ejercen un efecto antiinflamatorio contrarregulando la acción de los Th1. La diferenciación hacia uno u otro tipo de linfocitos colaboradores está condicionada por la estirpe celular de las CPA y por las citocinas que se encuentran en el medio. La presencia

de IL-4 condiciona el desarrollo de Th2, mientras la IL-12 el de Th1. Una vez diferenciadas, las Th1 segregan IL-2, linfotóxina o $\text{TNF}\beta$ e $\text{IFN}\gamma$ y las Th2, IL-4, IL-10, IL-13 e IL-5.

La IL-2 secretada por los linfocitos T activados juega un papel central en las respuestas inmunes específicas, constituyendo el principal factor de crecimiento de los linfocitos colaboradores (CD4^+) supresores/citotóxicos (CD8^+) y linfocitos B; estimula la actividad citotóxica mediada por linfocitos, células NK y células LAK (*células asesinas activadas por linfocinas*) así como la secreción de otras citocinas.

La IL-12 es considerada el principal mediador de la diferenciación Th1. Además, incrementa la actividad citotóxica de las células NK e induce las células LAK, a través de incrementar la producción de $\text{IFN}\gamma$ por los linfocitos T y células NK (Gately MK y cols. 1998).

El $\text{IFN}\gamma$ regula las respuestas inmunes específicas mediadas por Th1, tiene efecto antivírico, capacidad inmunomoduladora e inhibe la proliferación de linfocitos Th2 (Aderem A y Underhill DM. 1999, Gately MK y cols. 1998). La producción incrementada de $\text{IFN}\gamma$ inducida por la IL-12 es inhibida por la IL-4, $\text{TGF}\beta$ e IL-10 (Dong C y Flavell RA. 2001). La IL-8 induce secreción de $\text{IFN}\gamma$. Esta citocina además induce la síntesis de inmunoglobulinas que median la fagocitosis y la activación del complemento (Boehm U y cols. 1997).

La IL-4 promueve la diferenciación de precursores T colaboradores hacia el subtipo Th2 que inhibe la generación del subtipo Th1 (O'Garra A. 1998, Dong C y Flavell RA. 2001).

10.2.3 Citocinas con actividad antiinflamatoria e inmunosupresora

La IL-3, IL-4 e IL-10 activan las acciones de los linfocitos B a la vez que inhiben las respuestas inflamatorias.

Como hemos visto ya, la IL-4 promueve la diferenciación de precursores T colaboradores hacia el subtipo Th2 que inhibe la generación del subtipo Th1 (O'Garra A. 1998, Dong C y Flavell RA. 2001). Inhibe la producción de $\text{IFN}\gamma$ por los macrófagos (Choi P y Reiser H. 1998), y favorece la síntesis de Ig E e Ig G4.

La IL-10 es la citocina inmunosupresora por excelencia. Inhibe la secreción de múltiples citocinas como IL-12, IFN γ y TNF α y puede aumentar la expresión del inhibidor de citocina TNF-R (Moore KW y cols. 2001). Tiene actividad antifibrótica disminuyendo la expresión de colágeno 1 y aumentando la de la colagenasa intersticial. Disminuye la expresión espontánea o inducida de moléculas de adhesión en monocitos. Incrementa la producción de IL-1Ra, lo que potencia su actividad antiinflamatoria, ya que éste factor inhibe la acción de la IL-1 (Hoffmann KF y cols. 2000).

El TGF β incrementa la proliferación de fibroblastos, osteoblastos y células musculares lisas, lo que, unido a que incrementa la síntesis de proteínas de la matriz extracelular, favorece la curación de las heridas e induce fenómenos fibróticos. Inhibe la síntesis de varias citocinas y las funciones de citotoxicidad natural y específica (Blobe GC y cols. 2000).

El IFN α y el IFN β son citocinas supresoras debido a su capacidad antiproliferativa y a la disminución de la síntesis de citocinas proinflamatorias. Poseen además efecto antivírico al inhibir la replicación viral.

10.3 Receptores de citocinas

Las citocinas ejercen su función tras unirse a receptores específicos que se encuentran en la membrana celular. Éstos normalmente están constituidos por un dominio extracelular de unión al ligando y uno intracelular encargado de la transducción de la señal. Tras su unión al ligando, se induce internalización y la expresión de nuevos genes que serán los responsables de los cambios en la célula diana.

Una característica de gran relevancia de los receptores de citocinas es la aparición de formas solubles que conservan la capacidad de unión a su ligando. Estas formas se originan por proteólisis del receptor de membrana o por la generación de un ARNm truncado en la región codificadora para la secuencia de anclaje en la membrana celular. Estas formas solubles pueden neutralizar el efecto de la molécula o servir como transportador de la

misma. La activación celular se acompaña con frecuencia de una sobreexpresión de los receptores de membrana, a la vez que de un incremento en la circulación de las formas solubles.

10.4 Dificultades para evaluar la respuesta inmune específica

- Los clones de linfocitos T pueden producir diferentes patrones de citocinas dependiendo del estímulo. Además una determinada citocina puede ser producida por múltiples células (ej. macrófagos, linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺) y el perfil de éstas puede variar a nivel hepático dependiendo del estadio de la hepatitis C en cada paciente.

- La respuesta predominante puede variar con el tiempo. Una alta carga antigénica tiende a producir una respuesta de tipo 1 mientras que una baja carga da lugar a una respuesta de tipo 2.

- Las citocinas facilitan la comunicación entre las células, actuando como transmisores, y tienen una vida media muy corta. Su concentración puede variar según el lugar de medición.

- Los niveles de ARNm y determinadas proteínas pueden variar según el tejido estudiado y no reflejar de forma adecuada la función de la citocina estudiada.

11. Respuesta inmune y VHC

El mecanismo de persistencia del VHC y la progresión de la enfermedad son multifactoriales. En ellos participan factores virológicos y factores relacionados con el huésped, entre los que se incluyen las moléculas de adhesión intercelular, de activación linfocitaria y diferentes citocinas que se describen a continuación.

11.1 Interacción VHC-hepatocito

Para que se produzca la infección debe existir una adhesión efectiva del VHC a la célula huésped o hepatocito (Sanz-Cameno P y cols. 2002). Tras esta unión, el VHC puede penetrar en la célula mediante varios mecanismos: traslocación del virus a través de la membrana celular, endocitosis mediada por receptores celulares o fusión de la membrana celular con la envoltura del VHC (Agnello V y cols. 1999). Se ha demostrado que esta unión se lleva a cabo entre la proteína E2 de la envoltura viral y la proteína transmembrana CD81 que se encuentra en la membrana del hepatocito y de otras células, como los linfocitos (Wack A y cols. 2001, Maecker HT y cols. 1997). Una vez en el citoplasma de la célula huésped, la envoltura viral se escinde y el genoma del VHC comienza el proceso de replicación. Posteriormente se produce el ensamblaje del virus y sale de la célula a través de vesículas.

No existen claras evidencias a favor de un posible efecto citopático del VHC. Por el contrario, todos los estudios apuntan a la mediación de la respuesta inmune frente a antígenos virales en la patogenia de la hepatitis crónica C (Cerny A y Chisari FV. 1999). La respuesta inmune del huésped (innata y adaptativa celular particularmente), va a jugar un papel clave en la persistencia o eliminación del VHC; así, una inadecuada respuesta inmune puede favorecer la persistencia del VHC y el desarrollo de una hepatitis crónica. En este apartado se revisará la respuesta inmune y sus implicaciones patogénicas en relación con el VHC, haciendo especial énfasis en la respuesta celular de los linfocitos T (Chang KM. 2003, Liang TJ y cols. 2000).

11.2 Respuesta inmune humoral

El VHC induce una respuesta ejercida por anticuerpos específicos frente al virus que intentan opsonizarlo y evitar su entrada en las células del huésped. Pero este tipo de respuesta es incapaz de actuar sobre las células ya infectadas. La aparición de anticuerpos frente al VHC se detecta a las 7-8 semanas de la infección y al contrario de lo que sucede

en el VHA y VHB, indican cronicidad más que acción protectora (Schmilovitz-Weiss H y cols. 1993). Sólo un 15-25% de los pacientes con antiVHC positivo conseguirán eliminar el virus. No hay por tanto un patrón específico de anticuerpos asociado a la clínica o a la respuesta virológica.

El VHC evade la respuesta inmune humoral generando un gran número de mutaciones en la región hipervariable (HVR1) de la proteína de la envoltura E2, que es reconocida por los anticuerpos neutralizantes, pero además deben de existir otros mecanismos que evadan dicha respuesta pues en pacientes sin dichas mutaciones también persiste la infección viral (Habersetzer F y cols. 1998, Farci P y cols. 1996, Farci P y cols. 2000, Bassett SE y cols. 1999, Major ME y cols. 1999, Rehmann B. 2000).

Por tanto, la respuesta inmune humoral frente al VHC no parece ser muy efectiva ni duradera; Quizás pueda conseguir el control de algunos casos de hepatitis C aguda, pero no la mayoría (Takaki A y cols. 2000).

11.3 Respuesta inmune celular

La respuesta inmune celular es crucial para la eliminación o persistencia de la infección por VHC. Se cree que la existencia de un desequilibrio entre la respuesta Th1 y Th2 puede estar implicada en el desarrollo de la enfermedad así como de la imposibilidad de aclarar el virus (Bertoletti A y Ferrari C. 2003, Prezzi C y cols. 2001).

La existencia de una importante respuesta de tipo Th1, y una débil o ausente respuesta Th2 favorece la eliminación del virus tanto en los casos de infección aguda por el VHC como en los pacientes con hepatitis crónica tratados con IFN α o INF pegilado y rivabirina (Tsai SL y cols. 1997, Missale G y cols. 1996, Chang KM y cols. 2001, Day CL y Walker BD. 2003, Trapero-Marugán M y cols. 2006). Los pacientes que desarrollan una hepatitis crónica C muestran predominantemente una respuesta Th2 y una débil respuesta Th1 (Boyer N y Marcellin P. 2000, Kamal SM y cols. 2001). Por tanto, el efecto de las citocinas Th1 (INF γ , IL-2 y TNF α) es crucial para la protección contra la infección por VHC

mientras que la producción de citocinas Th2 (TGF β , IL-4, IL-5, IL6 e IL10) puede inhibir la respuesta inmune del paciente y favorecer la persistencia de la infección. Existe un grupo importante de pacientes que presentan persistencia de la infección por el VHC a pesar de una fuerte respuesta Th1, esto es debido a la importante capacidad del virus para mutar y escapar así del sistema inmune (Simmonds P. 1995).

Además, se ha visto que la acción de los linfocitos T CD4⁺ es fundamental para conseguir la eliminación del virus. Así, la existencia de una respuesta vigorosa de los linfocitos T CD4⁺ se asocia a niveles más bajos de transaminasas y menor grado de fibrosis en el tejido hepático (Chang KM y cols. 2001).

En el hígado de los sujetos con infección crónica por VHC se ha apreciado una infiltración predominante de linfocitos T CD4⁺ que secretan citocinas tipo Th1 y estimulan la respuesta citolítica de los linfocitos CD8⁺ (Accapezzato D y cols. 2004, Day CL y Walker BD. 2003). Éstos no sólo tienen la capacidad de lisar los hepatocitos autólogos sino que producen una serie de citocinas como el TNF α (Napoli J y cols. 1996), que produce activación de las células de Kupffer (macrófagos hepáticos) y activa en ellas la producción de TGF β ₁, lo que llevaría a la fibrosis hepática.

Existe una subpoblación de linfocitos T CD4CD25⁺, que supone un 5% de los linfocitos T CD4⁺, cuya principal acción, o al menos la única conocida hasta ahora, consiste en la supresión de los linfocitos T CD8⁺ y CD4⁺ a través de la síntesis de IL-10 y TGF β ; se especula acerca de su papel en la cronificación de la infección por el VHC y en la ausencia de respuesta al tratamiento antiviral, ya que en estos pacientes se ha observado una mayor proporción de linfocitos CD4CD25⁺ en sangre periférica (Sugimoto K y cols. 2003).

La intensidad de la lesión hepática y su pronóstico dependen de la interrelación entre los antígenos víricos y la respuesta inmunológica del paciente. Los linfocitos T citotóxicos (LTC) que infiltran el parénquima hepático persiguen la erradicación del VHC mediante la lisis de las células infectadas, pero la persistencia del virus evadiendo la respuesta inmune

perpetúa la reacción inflamatoria y el daño hepatocelular. La patogenia de las lesiones en la hepatitis crónica C viene definida por dos aspectos fundamentales: 1) capacidad del VHC para confundir o evadir la respuesta inmune y 2) vigor de la respuesta cooperadora (Th1) y de la reacción de los LTC para alcanzar la lisis de los hepatocitos infectados.

Los mecanismos patogénicos responsables del daño hepático asociado a la infección crónica por el VHC se resumen en las distintas fases de la respuesta inmunológica:

1) Reclutamiento intrahepático de los linfocitos y adhesión intercelular

Las células de estirpe linfoide no interaccionan cuando circulan en fase de reposo. Al producirse el reconocimiento específico de un antígeno los linfocitos se adhieren entre sí, formando agregados linfoides, o a otras células, por ejemplo las células endoteliales. Éstas, cuando existe un proceso inflamatorio, se activan y aumentan la expresión de moléculas de adhesión en su membrana (Patarroyo M y Makgoba MW. 1989), entre las que se encuentran ELAM-1 ("Endotelial Leukocyte Adhesion Molecule-1"), ICAM-1 ("Intercellular Adhesion Molecule-1"), VCAM-1 ("Vascular Cell Adhesion Molecule-1"). Las moléculas de adhesión vascular participan en el reclutamiento y migración de los linfocitos desde el espacio intravascular hacia el parénquima inflamado.

2) Presentación y reconocimiento de antígenos

Los linfocitos T citotóxicos (LTC) reconocen antígenos víricos presentados en asociación a las moléculas de HLA de clase I. La respuesta mediada por los linfocitos T es esencial para la erradicación del VHC, a la vez que se ha demostrado decisiva para alcanzar unos resultados favorables con el tratamiento antiviral (Nelson DR y cols. 1998).

3) Activación linfocitaria y necrosis hepatocelular

Los linfocitos T CD8⁺ predominan en sangre periférica y en las áreas de necrosis tisular típicas de la hepatitis crónica víricas.

La fibrosis hepática resulta de la acumulación excesiva de productos de la matriz extracelular cuyo principal componente es el colágeno (Poynard T y cols. 2001). El colágeno, las metaloproteinasas (MMPs) e inhibidores de proteasas (TIMPs) son producidos sobre todo por miofibroblastos que derivan de las células estrelladas hepáticas (Friedman JL. 2000) y fibroblastos activados (en las áreas portal y perivascular), paso inicial a la fibrosis hepática. El TGFβ₁ es una citocina profibrótica liberada durante la inflamación, regeneración tisular y fibrogénesis (Bissell DM y cols. 2001).

12. Citocinas en hepatitis crónica C

En los pacientes con hepatitis crónica C se ha observado una correlación entre los niveles de los receptores circulantes para TNFα, sTNFR1 y sTNFR2, y de las citocinas IL-10 e IL-15 con la progresión de la infección. Así, los niveles elevados de sTNFRs se asocian a progresión de la enfermedad y los niveles de IL-10 e IL-15 reflejan el grado de inflamación hepática. Además se ha establecido la existencia de una correlación positiva entre los niveles sTNFRs y las cifras de GGT e IgG (Kakumu S y cols. 1997).

Además, se ha comprobado que los pacientes con hepatitis crónica C presentan niveles séricos elevados de TNFα, sTNFRs y TGFβ. Los dos primeros guardan relación con el grado de actividad histológica de la enfermedad mientras que el TGFβ se correlaciona con el grado de fibrosis. Tanto los niveles de TNFα como de TGFβ séricos descienden en aquellos pacientes respondedores al tratamiento antiviral a la vez que mejora el grado de inflamación y fibrosis (Kallinowski B y cols. 1998, Neuman MG y cols. 2002a, Neuman MG y cols. 2002b, Neuman MG y cols. 2002c, Sypniewski D y cols. 2004).

También, se ha observado correlación entre los niveles séricos de sTNFR2 y el nivel de transaminasas (AST, ALT; GGT) y gammaglobulinas así como un descenso en los niveles del mismo tras tratamiento con interferón (Itoh Y y cols. 1999).

Se ha observado en determinados estudios una correlación positiva entre la concentración de ARNm de TGF β_1 en tejido hepático y el grado de fibrosis (Kanzler S y cols. 2001). Además, en los pacientes que responden al interferón alfa se observa una reducción significativa de ARNm del TGF β_1 en el hígado (Neuman MG y cols. 2002b). Por otro lado, el TGF β_1 puede inhibir la activación de los linfocitos T citotóxicos.

Además, en los estudios realizados en tejido hepático se ha observado un aumento del ARNm de citocinas de tipo Th1 (IL-2, IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF α e IFN γ), en comparación con cirrosis de origen alcohólico o idiopático (Neuman MG y cols. 2002b). Los niveles de IL-2 e IFN γ se correlacionan con el grado de daño histológico así como de una ausencia de respuesta al IFN α .

13. Factor de necrosis tumoral (TNF)

13.1 Introducción

En 1968, el Dr. Gale A. Granger de la Universidad de California, Irvine, describió una sustancia con actividad citotóxica producida por los linfocitos y la denominó linfotoxina (LT). En 1975, el Dr. Lloyd Old del Sloan-Kettering Memorial Cancer Center, Nueva York, describió otra sustancia también con actividad citotóxica producida por los macrófagos y la denominó *Tumor necrosis factor* (TNF); (Williams TW y Granger GA. 1968, Carswell EA y cols. 1975). Ambos efectos citotóxicos se describieron debido a la capacidad de producir muerte de las células L-929 del fibrosarcoma murino.

Posteriormente en 1984 se observó que el TNF presentaba un efecto antitumoral tanto *in vivo* como *in vitro*, capaz de producir necrosis hemorrágica de tumores trasplantables en ratones (Old LJ. 1985).

Dada la existencia tanto de homologías estructurales como funcionales entre el TNF y la LT se pasó a denominarles $\text{TNF}\alpha$ y $\text{TNF}\beta$ respectivamente. Ambas interaccionan con los mismos receptores y son mediadores patogénicos de enfermedad.

Se han identificado al menos 19 miembros distintos de la superfamilia TNF, todos ellos muestran un 15-25% de homología de aminoácidos en su secuencia (Aggarwal BB y cols. 2002, Locksley RM y cols. 2001). Los miembros de la familia TNF juegan un papel importante tanto en procesos fisiológicos como patológicos, como son: proliferación y diferenciación celular, apoptosis, modulación de la respuesta inmune e inducción de inflamación, así como en la enfermedad injerto contra huésped, leucemia, sepsis, diabetes, cáncer, osteoporosis, esclerosis múltiple, enfermedad de Crohn y artritis reumatoide. También se han visto implicados en la resistencia a la insulina, fallo cardíaco congestivo, aterosclerosis, pancreatitis y daño hepático por alcohol entre otros (Papadakis KA y Targan SR. 2000).

13.2 Células productoras

El $\text{TNF}\alpha$ es una citocina proinflamatoria liberada por monocitos/macrófagos, linfocitos T, linfocitos B, células natural killer (NK), células cebadas, células mesenquimales y epiteliales intestinales, células de Paneth, queratinocitos, astrocitos y células de la microglia, células del músculo liso y algunas líneas celulares tumorales. La producción de TNF comienza en respuesta a determinados estímulos, entre los que se encuentran: IL-12, factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos, factor estimulador de colonias de macrófagos, infecciones virales, ligandos del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) como superantígenos bacterianos, rayos X, etc. (Vassalli P. 1992).

13.3 Genética y proteómica

El gen del $\text{TNF}\alpha$ se encuentra en la región de clase III del MHC, aproximadamente 250 kilobases centromérico al locus HLA-B y 850 kilobases telomérico al HLA-DR. Está constituido por 4 exones y 3 intrones. La secuencia de 110 pares de bases de ADN entre la zona final 3' del gen de la linfotoxina α y la final 5' del $\text{TNF}\alpha$ es fundamental para el control de la transcripción (Papadakis KA y Targan SR. 2000).

El TNF origina una proteína transmembrana, precursora, de 26 kDa (proTNF), la cual, tras la acción de una metaloproteasa, enzima convertidora del $\text{TNF}\alpha$ (TACE), es liberada al citosol como una proteína soluble de 17 kDa. Posteriormente ésta se agrega a un complejo trimolecular, el cual se une y activa sus receptores (Papadakis KA y Targan SR. 2000).

13.4 Receptores de TNF

Las respuestas inducidas por TNF son mediadas a través de la unión de éste con cada uno de sus receptores. Existen dos tipos de receptores para el $\text{TNF}\alpha$, el TNFR1 (p55, CD120a) y el TNFR2 (p75, CD120b) (Kallinowski B y cols. 1998, Vandenabeele P y cols. 1995).

El TNFR1 se expresa en múltiples líneas celulares siendo capaz de inducir apoptosis, mientras que el TNFR2 se encuentra fundamentalmente en leucocitos y células endoteliales y juega un papel potenciador, pero su mecanismo de acción no se conoce (Locksley RM y cols. 2001).

Ambos son proteínas transmembrana tipo I con homología del 28%, sobre todo en su dominio extracelular.

Las moléculas de estos receptores pueden ser circulantes y aparecer como proteínas solubles tras el desdoblamiento proteolítico de los receptores de membrana, en suero, orina o sobrenadante de cultivos celulares.

Los receptores solubles tienen capacidad de unirse a la citocina y, por lo tanto, compiten con los receptores celulares, actuando como inhibidores y reguladores de la actividad de la misma. La determinación de las concentraciones séricas del receptor soluble de una citocina es una manera indirecta de calibrar el grado de activación de las vías en que ésta implicada.

El sTNFR2 es más abundante en suero y presenta una mayor afinidad por $\text{TNF}\alpha$, lo que le confiere mayor importancia para atenuar la actividad del TNF (Kakumu S y cols. 1997).

Su presencia está modulada por diferentes procesos. La IL-2, la activación de los linfocitos T así como la maduración de los macrófagos y la presencia de activadores de las protein-quinasas incrementan la presencia tanto de TNFR1 como de TNFR2. Éstos disminuyen en presencia de H_2O_2 , epinefrina, insulina y somatostatina.

13.5 Vías de señal a través de TNFR1 y TNFR2

El TNFR1 contiene un dominio *death* (DD) de unos 70 aminoácidos que es importante para la apoptosis y la activación de NF- κ B. Existe un ligando citoplasmático de 60 kDa, el SODD (silenciador de DD) que mantiene inactivo el TNFR1. Tras la unión del $\text{TNF}\alpha$ al TNFR1 se produce disociación de SODD del dominio citoplasmático DD del receptor, permitiendo que otras proteínas que contengan el dominio DD se unan al TNFR1, como TRADD (receptor TNF asociado a DD). TRADD recluta otras proteínas entre las que se encuentran: FADD (Fas asociado a DD), TRAF2 (receptor TNF asociado a factor 2), y RIP (proteína de interacción con receptor) y formar así un complejo de señal con TNFR1 con el fin de activar la cascada de señales que conducen a la apoptosis.

FADD induce apoptosis por interactuar con caspasa 8. La interacción de TRADD con TRAF2 y RIP dará lugar a la activación de señal de NF- κ B y JNK (Rothe M y cols. 1995).

El complejo del receptor activa la I κ B cinasa (IKK α -IKK β) a través de dos vías sinérgicas: 1) La fosfatidilinositín 3'-OH cinasa (PI3K)-Akt / protein cinasa B y 2) La vía de señal TRAF2-NIK (cinasa inductora NF- κ B) (**figura 12**).

La cinasa I κ B luego fosforila el I κ B, dando lugar a la disociación del complejo I κ B /NF- κ B y liberando NF- κ B, el cual se transloca al núcleo y induce la transcripción de genes asociados con la inflamación, defensa del huésped y supervivencia celular (Heyninck K y cols. 2003).

El NF- κ B es un factor de transcripción implicado en la supresión de la apoptosis mediante la inducción de múltiples proteínas antiapoptóticas que suprimen la activación de la caspasa (IEX-IL, TRAF-1, TRAF2, c-IAP1 y c-IAP2) (Wu MX y cols. 1998, Wang CY y cols. 1998); además está implicada en la supervivencia celular, proliferación, replicación viral, inflamación, reabsorción ósea, tumorigénesis y metástasis (Garg A y Aggarwal BB. 2002)

La apoptosis puede producirse por la vía de la proteína FADD/caspasa 8; la caspasa 8 activada induce liberación de factores proapoptóticos como citocromo c que dan lugar a la activación de la caspasa 9. Bien directamente o a través de su efecto sobre la caspasa 9, caspasa 8 promueve la activación de la caspasa 3 y caspasa 7 que dan lugar a la muerte celular (Beyaert R y cols. 2002).

TRAF2 activa NF- κ B a través de NIK (cinasa inductora NF- κ B) y JNK a través de MEKK1 (Rothe M y cols. 1995).

TRAF-1 interacciona directamente con TNFR2 e indirectamente con TNFR1 a través de TRADD.

Tras su unión al receptor el TNF α tiene la capacidad de reclutar secuencialmente distintas sustancias encargadas de modular la respuesta inmune bien favoreciendo la muerte celular o apoptosis (TNF α /FasL/TRADD/FADD) o inhibiéndola (TNF α /TRADD/TRAF2/RIP/NF- κ B). La heterogeneidad de la respuesta resulta de una expresión variable de factores de transcripción NF- κ B en las distintas células y tejidos.

13.6 Funciones del TNF

- Altera la remodelación tisular, la permeabilidad de la barrera epitelial, la activación de macrófagos y reclutamiento del infiltrado inflamatorio y la regulación de moléculas de adhesión.
- Además juega un papel en el desarrollo, homeostasis y respuesta adaptativa del sistema inmune.
- Regulación tejido graso. El TNF α es producido y secretado por los adipocitos. Su función puede ser paracrina y/o autocrina. Entre estas acciones se encuentran la inducción de la lipólisis, inhibición de las señales de insulina, y alteración de la expresión de genes del adipocito a través de la activación de NF- κ B así como la sensibilidad de los adipocitos a la insulina. Además tiene la capacidad de inhibir la síntesis de múltiples proteínas específicas de adipocito, incluida Acrp30 (adiponectina).
- Estimula los macrófagos hepáticos para producir TGF β , citocina que activa las células estrelladas y aumenta la producción de matriz extracelular, paso inicial para el desarrollo de fibrosis hepática.

13.7 Papel del TNF α en la enfermedad hepática

El fallo hepático agudo es un síndrome clínico que resulta de una necrosis masiva y apoptosis de las células hepáticas, lo que da lugar a encefalopatía y deterioro severo de la función hepática.

El TNF α originalmente se identificó por su capacidad para inducir necrosis hemorrágica de tumores en el ratón, pero no se emplea en el tratamiento del cáncer por producir importantes efectos secundarios antes de alcanzar dosis terapéuticas. Entre los efectos secundarios destacan la elevación de transaminasas así como de bilirrubina lo que indica un efecto citotóxico directo sobre los hepatocitos humanos.

Entre los efectos del TNF destacan la inducción tanto de una respuesta proliferativa como antiinflamatoria, así como su papel como mediador importante de la apoptosis (muerte celular programada) (Diehl AM y Rai R. 1996, Leist M y cols. 1995).

Los hepatocitos son normalmente resistentes a la citotoxicidad inducida por el TNF pero sufren muerte celular por activación del TNF α e inhibición de la transcripción del factor NF- κ B.

Se ha visto que el TNF α se encuentra implicado en las hepatitis virales, la enfermedad hepática alcohólica y el fallo hepático fulminante, dado que se ha observado un aumento tanto de los niveles séricos como de su receptor en dichas patologías (González-Amaro R y cols. 1994, Muto Y y cols. 1988, Zylberberg H y cols. 1999). En el caso de la enfermedad hepática alcohólica se ha observado una correlación inversa entre los niveles de TNF α y la supervivencia de los pacientes, es decir, a mayor nivel sérico de TNF α menor supervivencia.

En los pacientes con hepatitis crónica por virus C se ha observado un incremento de la expresión intrahepática así como de la producción de TNF α por las células mononucleares (Yoshioka K y cols. 1989, Yoshioka K y cols. 1990) así como unos niveles séricos de TNF α superiores a los observados en sujetos sanos (Crespo J y cols. 2002).

Además, a nivel hepático presentan una mayor cantidad de ARNm del $\text{TNF}\alpha$ que en sujetos sanos y que guarda correlación con el grado de respuesta al tratamiento, es decir los pacientes con RVS presentan unos niveles más bajos de ARNm del $\text{TNF}\alpha$ (Taliani G y cols. 2002).

14. Factor de transformación de crecimiento β_1 ($\text{TGF}\beta_1$)

El $\text{TGF}\beta_1$ es una proteína de 25 kDa, sintetizada por una multitud de células (células de Kupffer, células endoteliales, hepatocitos dañados, etc). Es liberado de la región C-terminal de un dímero disulfuro de $\text{proTGF}\beta$ por una proteasa convertasa. Es normalmente secretado en forma latente o inactiva.

Hay 2 tipos de complejos latentes:

- a) Uno pequeño, formado por el $\text{TGF}\beta_1$ unido de forma no covalente a un dímero disulfuro de la parte N-terminal de $\text{proTGF}\beta$, denominado LAP (péptido asociado a latencia).
- b) Uno grande, que contiene una proteína de unión al $\text{TGF}\beta$ latente (LTBP) unida por puente disulfuro a LAP.

Las proteínas de latencia contribuyen a la estabilidad del TGF.

La vida media del $\text{TGF}\beta_1$ libre es de aproximadamente de 2 minutos mientras que el $\text{TGF}\beta$ latente tiene una vida media de 90 minutos.

Para ejercer su acción se requiere la liberación del $\text{TGF}\beta_1$ del complejo latente.

Entre las funciones de TGF destacan:

1. Modulación de la proliferación celular, generalmente como supresor
2. Facilita el deposito de matriz extracelular a través de un aumento de la síntesis de sus componentes y una menor degradación al inhibir la producción de enzimas proteolíticas (Metaloproteinasas 1 y 3) y aumentar la expresión de inhibidores de proteasas (TIMP-1)
3. Inmunosupresor

Según un estudio reciente, se ha comprobado que el TGF β no sólo activa al receptor tipo 1 del TGF β sino que también activa a la c-Jun N-terminal cinasa (JNK), la cual convierte al mediador Smad en dos isoformas fosforiladas distintas: pSmad3C y pSmad3L. Mientras la vía del receptor tipo 1/pSmad3C produce la supresión del crecimiento epitelial ya vía JNK/pSmad3L promueve el depósito de matriz extracelular. Así se ha visto que los sujetos con mayor estadio de fibrosis, mayor grado de necroinflamación así como carcinoma hepatocelular presentaban una activación de pSmad3L y menor actividad de pSmad3C (Matsuzaki K y cols. 2007) .

14.1 TGF β_1 y hepatitis crónica C

Las células de Kupffer activadas por el TNF α incrementan la producción de TGF β_1 , inductor directo de la apoptosis y potente estímulo de la síntesis de proteínas de la matriz extracelular por las células estrelladas (Friedman SL. 2000). La fibrosis hepática se desarrolla porque existe un depósito aumentado de proteínas de la matriz extracelular como resultado de un desequilibrio entre la existencia de una fibrogénesis aumentada y un descenso de la fibrolisis (Friedman SL. 1993).

En los pacientes con hepatitis crónica C se ha observado un aumento de los niveles de TGF β tanto a nivel hepático (TGF ARNm) como en plasma y orina (Nelson DR y cols. 1997, Verma V y cols. 2008).

Se ha señalado que los niveles séricos de TGF β_1 pueden estar en relación con el estadio de fibrosis hepática en los pacientes con hepatitis crónica C independientemente del grado de actividad necroinflamatoria (Neuman MG y cols. 2002, Janczewska-Kazek E y cols. 2006). En un estudio reciente Neuman MG y cols (Neuman MG y cols. 2007) comprobaron que existe un aumento de los mismos hasta el estadio F3 de fibrosis, de acuerdo con la puntuación de Knodell (Knodell RG y cols. 1981), sin embargo, esta tendencia se invertía al

considerar los niveles de $\text{TGF}\beta_1$ en los pacientes con fibrosis estadio 4 (cirrosis hepática), en los que estas concentraciones eran menores que las detectadas en los estadios iniciales (0 y 1) de fibrosis.

Los pacientes respondedores al tratamiento antiviral además de presentar una mejoría en el grado de fibrosis presentan un descenso de los niveles séricos de $\text{TGF}\beta_1$ (Neuman MG y cols. 2002a, Neuman MG y cols. 2002b, Neuman MG y cols. 2002c, Janczewska-Kazek E y cols. 2006, Verma V y cols. 2008).

A nivel hepático se ha observado mayor cantidad de $\text{TGF}\beta_1$ en las áreas de mayor fibrosis y actividad histológica (Kinnman N y cols. 2000).

ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN

Una adecuada respuesta del huésped contra el virus C es necesaria para su eliminación, lo que requiere un esfuerzo coordinado tanto de la respuesta inmune antígeno específica como de la no antígeno específica, incluyendo citocinas y quimiocinas (Tilg H y cols. 1992, Koziel MJ. 1999, Neuman MG. 1998).

La respuesta de linfocitos T presenta dos patrones, la tipo 1 helper (Th1) asociada con la regulación de la respuesta inmune celular y la tipo 2, que juega un papel importante en la respuesta a antígenos o respuesta inmune humoral. La alteración del equilibrio entre las citocinas de tipo 1 (IL-1, IL-2, IL-6, IL-12, IL-18, $\text{TNF}\alpha$), y las de tipo 2 (IL-4, IL-10) en el tejido hepático y en sangre periférica puede contribuir a la persistencia viral y al desarrollo de una hepatitis crónica (Jacobson-Brown PM y Neuman MG. 2001). Además el virus C presenta una viabilidad intrínseca mayor que el virus B, lo que explicaría la capacidad del mismo a escapar del sistema inmune y de desarrollar una infección crónica a pesar de una potente respuesta Th1, la más adecuada para eliminar el virus, por lo tanto, lo más que consigue la respuesta Th1 es mantener una tasa baja de replicación viral (Ferrari C. y cols. 1999, Bertoletti A. y cols. 1997).

Los linfocitos T citotóxicos específicos para el VHC que infiltran el hígado no sólo tienen la capacidad de inducir una respuesta de tipo Th1, con liberación de citocinas como $\text{TNF}\alpha$, IL-2, $\text{IFN}\gamma$, GM-CSF e IL-8, sino que además poseen la capacidad de lisar directamente los hepatocitos (Koziel MJ. 1999). El grado de expresión de estas citocinas está en relación con el grado de lesión histológica así como con el riesgo de fracaso terapéutico del interferón-alfa, tanto en sujetos que no lo habían recibido previamente como en los que reciben un segundo ciclo de tratamiento (Napoli J y cols. 1996, Fukuda R y cols. 1996, Dumoulin FL y cols. 2001, Neuman MG y cols. 2001a, Neuman MG y cols. 2001b).

Se ha demostrado la presencia de $\text{TNF}\alpha$ tanto en las áreas de inflamación como en las de fibrosis en los pacientes con hepatitis crónica C, lo que sugiere que el $\text{TNF}\alpha$ puede

jugar un papel importante en la puesta en marcha, mantenimiento y amplificación de la respuesta inflamatoria que induciría a su vez el daño hepático crónico y progresivo.

Esta respuesta inflamatoria sostenida contribuye al incremento de la fibrogénesis hepática. Las células de Kupffer son activadas por el $\text{TNF}\alpha$ e incrementan la producción de $\text{TGF}\beta_1$, inductor directo de la apoptosis y potente estímulo para la síntesis de proteínas de la matriz extracelular por las células estrelladas, primer paso para la fibrosis (Chen RH y Chang TY. 1997, Gressner AM. 1995). Se ha observado en distintos estudios una reducción significativa de los niveles de $\text{TGF}\beta_1$ en los pacientes que responden al tratamiento (Kinnman N y cols. 2000), bien con interferón o con interferón y ribavirina, así como una disminución paralela tanto del $\text{TGF}\beta_1$ como del grado de fibrosis en la biopsia hepática (Neuman MG y cols. 2002a).

El $\text{TNF}\alpha$ desencadena una serie de respuestas celulares mediante su unión a dos tipos de receptores específicos en la superficie celular: TNFR-p55 (TNFR-1) y TNFR-p75 (TNFR-2), de 55 y 75 kD de peso molecular respectivamente. Éstos se pueden encontrar unidos a la superficie celular o en forma soluble en el suero. Tras la unión del $\text{TNF}\alpha$ a cada uno de estos receptores ubicados en la membrana celular se desencadenaran diferentes tipos de respuestas intracelulares.

La función de estos receptores cuando son circulantes es la de contrarrestar o modular, amortiguando el efecto deletéreo de las concentraciones excesivas de $\text{TNF}\alpha$.

En los enfermos con infección crónica por VHC existe un aumento de los niveles séricos de los TNFR s que está en relación directa con el grado de inflamación en la biopsia hepática y con el grado de citolisis manifestada por las transaminasas séricas, no así con el grado de respuesta al tratamiento con interferón alfa.

Como la vida media del $\text{TNF}\alpha$ es corta y sus concentraciones son muy fluctuantes algunos autores recomiendan medir las concentraciones del receptor soluble del $\text{TNF}\alpha$ y en

especial del sTNFR-2 como índice de la producción de $\text{TNF}\alpha$, que está directamente relacionado con la progresión de la enfermedad crónica por VHC (Crespo J y cols. 2002).

Los sujetos infectados por el VHC muestran niveles séricos de $\text{TNF}\alpha$, sTNFR-2, IL-6, IL-12 y $\text{TGF}\beta$ superiores a los sujetos sanos (Neuman MG y cols. 1999, Verma V y cols. 2008) mientras que los niveles de $\text{TNF}\alpha$ son menores que los observados en los sujetos con hepatitis alcohólica o colangitis esclerosante primaria (Neuman M y cols. 2002).

Además se ha observado que los niveles de $\text{TNF}\alpha$ son capaces de reflejar el grado de inflamación hepática mientras que el $\text{TGF}\beta$ refleja el grado de fibrosis hepática (Neuman M y cols. 2002).

Con estos planteamientos cabe extraer las siguientes conclusiones de trabajo:

1. La infección por VHC desencadena una respuesta Th1, que aun siendo cualitativamente la más adecuada, no es capaz de eliminar el virus en la mayor parte de los casos, con el consiguiente paso a la cronicidad.
2. Esta respuesta está presidida, potenciada y perpetuada por el $\text{TNF}\alpha$.
3. El objetivo terapéutico inicial debe ser, siempre que sea posible, la eliminación del virus mediante el mejor tratamiento disponible (PEG-IFN alfa + ribavirina, en el momento actual).
4. Cuando este objetivo no se logra, persiste una activación de la respuesta Th1, especialmente a través del $\text{TNF}\alpha$, que perpetúa los mecanismos inflamatorios y fibrogénicos y contribuye a la evolución negativa de la enfermedad. En esta fase la modulación de la respuesta Th1, y en especial la del $\text{TNF}\alpha$, constituyen potenciales objetivos terapéuticos lógicos.
5. Antes de plantear este tipo de actuaciones terapéuticas, dirigidas específicamente a reducir la actividad del $\text{TNF}\alpha$ en el tejido hepático, es necesario disponer de marcadores fiables y accesibles que nos permitan valorar la expresión del $\text{TNF}\alpha$.

HIPÓTESIS

HIPÓTESIS

Los enfermos con afectación hepática crónica por infección persistente por VHC muestran una sobreexpresión de $\text{TNF}\alpha$ en tejido hepático que interviene de modo fundamental en la patogenia de la lesión hepática.

La concentración plasmática del receptor soluble de $\text{TNF}\alpha$ de tipo 2 (sTNFR-2) refleja de forma estable la concentración plasmática del propio $\text{TNF}\alpha$.

Existe correlación entre el grado de actividad analítica e histológica de la afectación hepática y la concentración plasmática de sTNFR-2 así como entre los niveles séricos de $\text{TGF}\beta_1$ y la fibrosis hepática.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

1. Determinar las concentraciones plasmáticas de sTNFR-2 en enfermos con infección crónica por VHC.
2. Correlacionar las concentraciones plasmáticas de sTNFR-2 con el índice de actividad bioquímica e histológica de la hepatopatía.
3. Determinar las concentraciones plasmáticas y la expresión hepática de $TGF\beta_1$ en los enfermos con infección crónica por VHC.
4. Comprobar si ambos parámetros están correlacionados, con el fin de definir si los niveles séricos de $TGF\beta_1$ son un buen marcador de los niveles de $TGF\beta_1$ hepático.
5. Correlacionar ambos parámetros con el índice de actividad bioquímica e histológica de la hepatopatía.
6. Valorar si los niveles de las citocinas estudiadas influyen en el grado de respuesta al tratamiento con PEG-interferón y ribavirina.

PACIENTES Y MÉTODOS

1. Pacientes

Se incluyen 127 pacientes consecutivos con hepatitis crónica C, 71 hombres y 56 mujeres, con una mediana de edad de 43 (22-66) años. Todos los pacientes cumplen los requisitos de inclusión que se describen a continuación:

- Infección por VHC detectada mediante positividad anti-VHC por la técnica de ELISA de segunda generación.
- Positividad del ARN del VHC detectado mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en el momento de la inclusión en el estudio.
- Elevación sérica de transaminasas de manera persistente durante más de 6 meses.
- Datos de hepatopatía crónica en la biopsia hepática.
- Ausencia de signos clínicos de cirrosis hepática descompensada.
- No haber recibido nunca tratamiento antiviral.
- Ausencia de antígeno de superficie del virus B y de infección por el VIH.
- Ausencia de enfermedad sistémica o regional importante, tanto inflamatoria, como tumoral, degenerativa, etc.
- Exclusión de alcoholismo, empleo de drogas hepatotóxicas, fenómenos de autoinmunidad o hepatopatía crónica metabólica.
- No haber sido tratados al menos en el último mes con medicamentos que pueden influir en la expresión del $\text{TNF}\alpha$ (sAME, betaína, pentoxifilina, silimarina, etc.).
- Autorización para la obtención de una muestra de sangre venosa en el momento de realizar la biopsia hepática.

Se realizó biopsia hepática percutánea, previo consentimiento informado, a todos los pacientes incluidos en el estudio (127 pacientes) como parte de la evaluación diagnóstica de su hepatopatía. Las muestras de biopsia hepática se fijan en formol al 4%

y se incluyen en parafina para su posterior análisis. En ellas, se evalúa el grado de actividad necroinflamatoria y de fibrosis mediante el índice de Knodell (Knodell RG y cols. 1981), así como los niveles de $\text{TGF}\beta_1$ a nivel hepático.

Simultáneamente a la realización de la biopsia hepática y previo consentimiento por parte del paciente se realizó extracción de 5ml de sangre venosa en tubos estériles sin aditivos. Posteriormente, la muestra se centrifuga a 4000G durante 10 minutos y se realiza separación del sobrenadante (suero) en alícuotas de unos 1,5 ml cada una para su posterior congelación a -70°C , donde permanecen hasta su posterior análisis (sTNFR-2 y $\text{TGF}\beta_1$).

Además, se recogieron datos epidemiológicos (edad, sexo), virológicos (genotipo, carga viral) y analíticos [hemoglobina, leucocitos, plaquetas, transaminasas (GOT, GPT), GGT, bilirrubina, albúmina y tiempo de protrombina] del sujeto a estudio previamente a la realización de la biopsia hepática.

2. Métodos

2.1 Análisis histológico

Todos los cilindros de biopsia hepática se fijan en formol al 4% y se incluyen en parafina según técnica habitual. En todos los casos se realizan las técnicas diagnósticas de rutina en patología hepática: hematoxilina eosina, tricrómico de Masson, PAS, tinción de Perls para pigmento férrico e impregnación argéntica de Wilder para fibras de reticulina. El grado de actividad necroinflamatoria y de fibrosis se mide utilizando un método semicuantitativo, el índice de Knodell (**tabla 7**) (Knodell RG y cols. 1981, Ferrari C. y cols. 1999).

2.2 Análisis virológico

-Técnicas empleadas para el diagnóstico del VHC

Los anticuerpos séricos del VHC se detectan mediante técnicas de enzimoimmunoanálisis de cuarta generación (ELISA). Los pocillos de la placa de poliestireno están revestidos de una mezcla de antígenos del VHC: Core, NS3; NS4 y NS5 (INNOTEST® HCV Ab IV). Para confirmar los resultados positivos se llevan a cabo técnicas de inmunoblot en papel de nitrocelulosa (INNO-LIA™ HCV Score), es un inmunoanálisis en tira de 3ª generación que incorpora antígenos de VHC derivados de la región principal, de la región hipervariable (HVR) E2, de la región helicasa NS3 y de las regiones NS4A, NS4B y NS5A.

-Técnicas para la determinación del ARN del VHC, carga viral y genotipo

Se emplean técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que se detallan a continuación.

- Determinación del ARN viral: Se utilizó el test COBAS AMPLICOR HCV, versión 2.0. Es un ensayo cualitativo de diagnóstico *in vitro* del VHC, basado en la técnica de transcripción inversa de ARN diana para generar un ADN complementario (ADNc), la amplificación del ADNc diana mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y su hibridación para detectar el ARN del VHC en plasma o suero humanos.
- Determinación de la carga viral, mediante el COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HCV Test, (Roche Diagnostics GMBH, Mannheim). Es una técnica de amplificación *in vitro* del ácido nucleico para la determinación cuantitativa de ARN del virus de la hepatitis C (VHC) en plasma o suero humano. Se emplea el instrumento COBAS AmpliPrep para el procesamiento automatizado de la muestra y el analizador COBAS Taqman o el analizador COBAS Taqman 48 para la amplificación y detección automatizadas. Esta técnica está basada en tres procesos principales: 1) preparación de la muestra para aislar el ARN del VHC, 2) transcripción reversa del ARN objetivo para generar ADN complementario (ADNc) y 3) amplificación mediante

PCR del ADNc objetivo y detección simultánea de una sonda de detección oligonucleótida doblemente marcada y escindida específica del objetivo.

- Determinación del genotipo viral, mediante el ensayo de genotipos (LiPA VERSANT®, Bayer HealthCare) que emplea la técnica de hibridación inversa. El ADN* biotinilado, obtenido mediante amplificación por RT-PCR (transcripción inversa-reacción en cadena de la polimerasa) de la región 5' no traducida (5'UTR) del ARN del VHC, es sometido a hibridación con sondas de oligonucleótidos inmovilizadas. Las sondas, que están unidas a una tira de nitrocelulosa por una cola poli (T), son específicas de la región 5'UTR de los diferentes genotipos del VHC.

2.3 Análisis sérico del receptor tipo 2 del $\text{TNF}\alpha$ (sTNFR-2)

La actividad del receptor soluble de $\text{TNF}\alpha$ (sTNFR-2) se mide mediante técnicas de ELISA. Para ello se emplea un kit ya comercializado por BioSource Europa S.A. (KAC1771). Primero se ponen en cada celdilla 50 microlitros de la muestra a analizar, luego se añaden 200 microlitros de una solución de conjugado anti-sTNFR-2 que se unirá al sTNFR-2 de la muestra y se deja incubar durante 1 hora. Tras incubación y posterior lavado de las celdillas se añade un cromógeno que teñirá cada celdilla de color azul de diferente intensidad según la concentración de sTNFR-2 presente en la misma. Posteriormente, se leen las absorbancias a 450nm en un espectrómetro con el fin de construir una curva estándar lineal, en la que la densidad óptica se encuentre en las ordenadas y las concentraciones estándares en las abscisas. Una vez que tenemos las distintas densidades ópticas de nuestras muestras, se interpolan en la curva estándar con el fin de conocer la concentración de sTNFR-2 existente en cada una de ellas.

2.4 Análisis sérico del TGF β_1

El análisis sérico TGF β_1 se realiza mediante inmunoanálisis (Quantikine®) con kit específico comercializado por R&D systems (DB100) de acuerdo con las instrucciones de manufacturación. Éste presenta una placa con 96 celdillas cubiertas de TGF β sRII recombinante humano. En primer lugar se procede a la preparación de las muestras y de los estándares (TGF β_1 recombinante humano) según se especifica en el kit, luego se añade 200 microlitros de cada uno de ellos en las celdillas y se incuba durante 3 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, tras lavado, se añaden 200 microlitros del conjugado de TGF β_1 (anticuerpo policlonal contra el TGF β_1 conjugado con peroxidasa de rábano picante) y se incuba de nuevo a temperatura ambiente durante 1,5 horas. Por último, se añade un cromógeno que dará color a las celdillas y se leen las densidades ópticas a 450 nm para así poder construir una curva patrón, que en este caso es una curva lineal, en la que la absorbancia se refleja en el eje de ordenadas (Y) y la concentración en el eje de abscisas (X) y se interpolan los datos obtenidos en nuestra muestra.

2.5 Análisis del TGF β_1 a nivel hepático

En una muestra seleccionada de biopsias hepáticas, se realiza una técnica de inmunohistoquímica para valorar la expresión del TGF β_1 con la máquina de tinción automática Techmate (DakoCytomation). Para ello, se utiliza un anticuerpo policlonal antiTGF β_1 (nº catálogo sc-146, Santa Cruz Biotechnology, inc.) a una dilución al 1:100 con pretratamiento, para realizar desenmascaramiento antigénico, en olla a presión con buffer citrato. La unión del anticuerpo primario se visualiza con el método de peroxidasa-antiperoxidasa y es revelada con diaminobencidina. Posteriormente, los cortes son contrastados con hematoxilina eosina.

Estudio cuantitativo: El estudio cuantitativo se realiza sobre las preparaciones de inmunohistoquímica mediante un sistema semiautomático de análisis de imagen Olympus con software de Microimage (ver. 4.0). Este sistema permite captar imágenes en color real directamente del microscopio mediante una cámara de video. Las imágenes se procesan posteriormente por un sistema de segmentación y determinación del umbral de color, que permite igualar todas las áreas de un color especificado. En nuestro caso el color de las áreas positivas por inmunohistoquímica es marrón, de forma que estas zonas son las medidas. Este procesamiento se puede realizar de forma automática o de forma manual. Si se realiza de forma automática se deben seleccionar previamente los valores de segmentación y umbral mientras que si se realiza de forma manual, no. Cuando se lleva a cabo de esta forma (manual), el cursor se sitúa en la pantalla sobre la zona teñida que se desee medir y se marca el valor para el posterior procesamiento. En nuestro estudio elegimos esta última metodología porque permite ajustar de forma más fina y exacta las zonas positivas que se desean medir. Las imágenes para cuantificación fueron captadas con un objetivo de 40x y ocular de 5x a lo largo de todo el cilindro de biopsia. Los resultados se expresan en porcentaje de tejido lobulillar hepático teñido positivamente con el anticuerpo antiTGF β_1 vs superficie total.

2.6 Métodos estadísticos

Todos los datos obtenidos se recogen en una base de datos y se someten a análisis estadísticos con el fin de establecer las correlaciones entre los valores analíticos, histológicos y el nivel de citocinas, para lo que empleamos es el coeficiente de correlación de Pearson (r) o de Spearman (rho) según las variables en estudio sigan o no una distribución normal.

Además se identifica a los sujetos que han recibido tratamiento antiviral con interferón pegilado y ribavirina a las dosis y duración establecidas por las guías de consenso según el genotipo viral, con el fin de poder establecer dos grupos de estudio, por un lado los respondedores y por el otro los no respondedores. Una vez identificados ambos grupos se emplean distintas pruebas analíticas, paramétricas o no, dependiendo de si los grupos a comparar siguen una distribución normal o no, con el fin de detectar diferencias estadísticamente significativas en los niveles basales de citocinas y si éstas pueden ser un posible marcador predictor de respuesta.

Para todo ello se ha empleado el paquete estadístico SPSS 15.0.

RESULTADOS

1. Datos demográficos y virológicos

Se han incluido 127 pacientes con hepatitis crónica C que mostraban los siguientes parámetros demográficos y virológicos (**tabla 10**).

Tabla 10: Datos demográficos y virológicos

	Frecuencia (%)
Sexo	
Hombres (♂)	71 (55,9%)
Mujeres (♀)	56 (44,1%)
Edad (intervalo)	43 años (22-66)
Hombres (♂)	42 años (22-63)
Mujeres (♀)	46 años (27-66)
Genotipo	
1 (♂ / ♀)	96 (52/44) (75,6%)
2 (♂ / ♀)	5 (3/2) (3,9%)
3 (♂ / ♀)	18 (14/4) (14,2%)
4 (♂ / ♀)	8 (2/6) (6,3%)
Carga viral	
≥ 500.000 U/ml	49 (38,6%)
Genotipo 1	37
Genotipo 2	0
Genotipo 3	10
Genotipo 4	2
< 500.000 U/ml	78 (61,4%)
Genotipo 1	59
Genotipo 2	5
Genotipo 3	8
Genotipo 4	6

Se han procesado las muestras de 7 controles sanos, 4 mujeres y 3 hombres con una mediana de edad de 31 años (28-33).

2. Niveles de sTNFR-2 en suero

En 126 pacientes con hepatitis crónica C se realizó análisis sérico de los niveles de sTNFR-2 mediante el empleo de un kit comercializado.

2.1. Comparación entre casos y controles

Los niveles séricos de sTNFR-2 son superiores en los pacientes con hepatitis crónica C en comparación con los controles $9,018 \pm 3,882$ ng/ml y $4,624 \pm 1,547$ ng/ml, respectivamente, $p < 0,001$ (tabla 11).

Tabla 11: Niveles de sTNF-2 en sujetos con hepatitis crónica C y controles

	Niveles de sTNFR-2 (ng/ml)	Nivel significación (p)
Casos (n:126)	$9,018 \pm 3,882$ ng/ml	<0,001
Controles (n:7)	$4,624 \pm 1,547$ ng/ml	

2.2. Análisis de los niveles de sTNFR-2 frente a parámetros bioquímicos

Para estudiar cómo se comporta el sTNFR-2 frente a los parámetros bioquímicos realizamos correlaciones entre las distintas variables a estudio y el sTNFR-2. En la **tabla 12** se muestran las distintas correlaciones estudiadas así como su grado de significación.

Tabla 12: Correlaciones entre los parámetros bioquímicos y el sTNFR-2

Parámetros bioquímicos	Rho de Spearman (rho)	Nivel significación (p)
AST	0,428	<0,001
ALT	0,439	<0,001
GGT	0,278	0,002
FA	0,113	0,208
Plaquetas*	-0,356*	0,002
Albúmina	-0,067	0,62
Sideremia	-0,002	0,981
Bilirrubina	0,015	0,873
T. Protrombina	-0,193	0,036
INR	0,206	0,036

* r de Pearson

Figura 13: Correlación de sTNFR-2 con las transaminasas (AST, ALT)

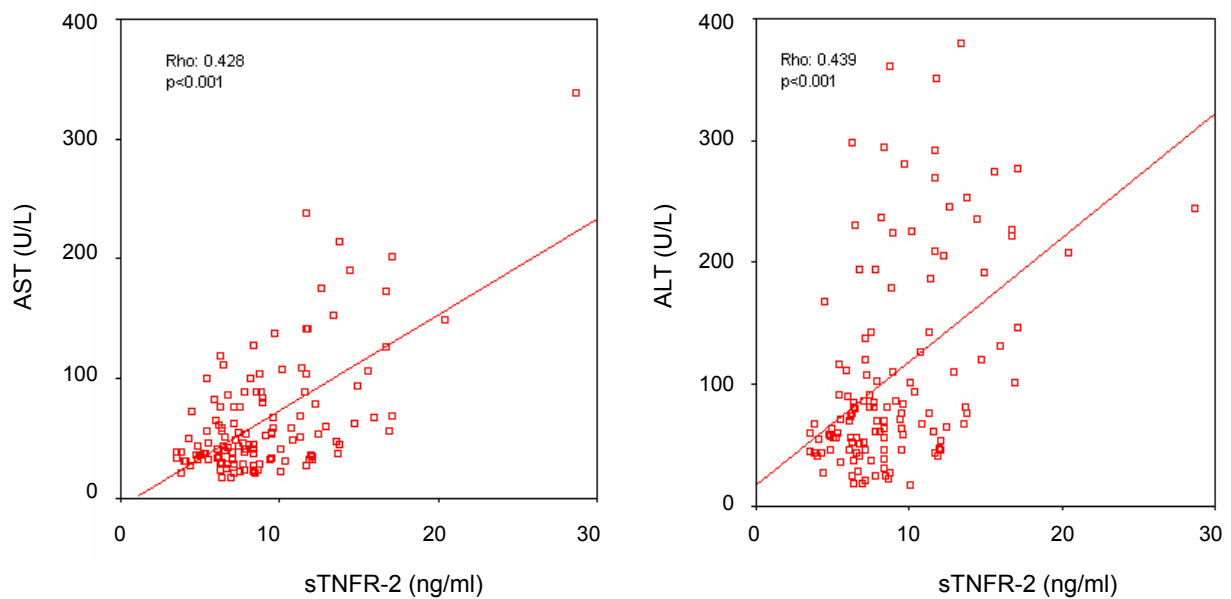
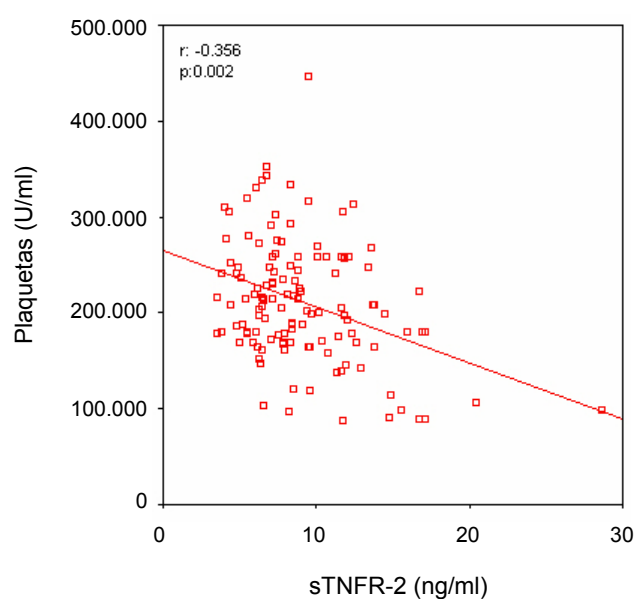


Figura 14: Correlación entre la cifra de plaquetas y el sTNFR-2

2.3. Análisis de los niveles de sTNFR-2 frente a parámetros histológicos

Al analizar si existe correlación entre el grado de actividad necroinflamatoria y de fibrosis en la biopsia hepática de los pacientes con hepatitis crónica C con los niveles séricos de sTNFR-2 se observó que existía una correlación positiva tanto con el grado necroinflamatorio ($\rho: 0,389$, $p < 0,001$) como con el grado de fibrosis hepática ($\rho: 0,331$, $p < 0,001$).

El grado necroinflamatorio se calculó sumando los tres primeros ítems del índice de Knodell, que miden el grado de necrosis periportal, la degeneración intralobular y necrosis focal y el grado de inflamación portal, respectivamente (ver **tabla 7**).

2.3.1. Análisis de los niveles de sTNFR-2 según el grado de actividad necroinflamatoria

Tras agrupar a los pacientes según el grado de actividad necroinflamatoria en tres grupos, actividad necroinflamatoria leve (1-4 puntos) (17 sujetos), moderada (5-8 puntos) (53 sujetos) y severa (9-13 puntos) (56 sujetos), se observó que los que

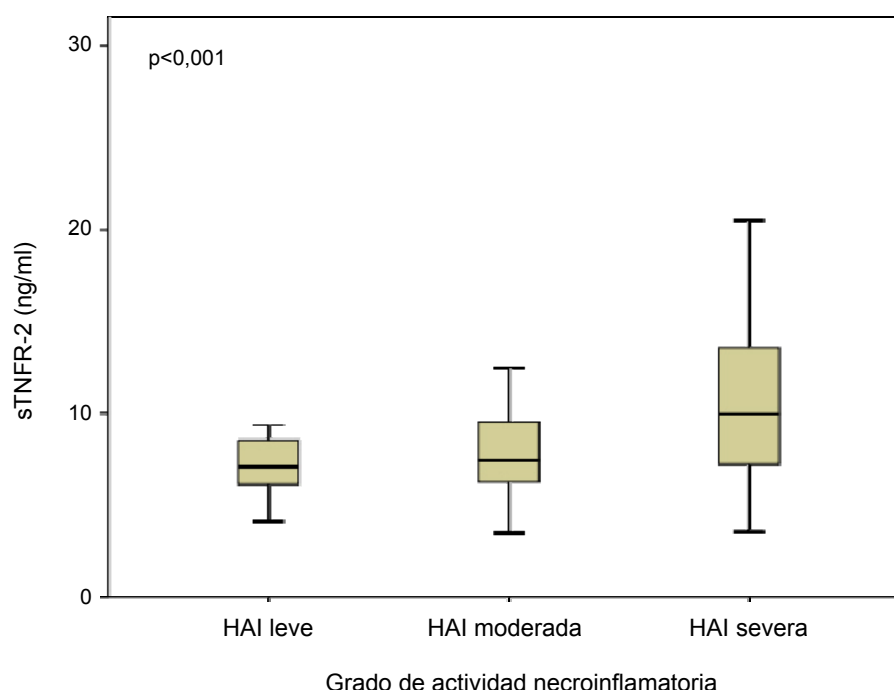
presentan una menor actividad necroinflamatoria (leve) muestran unos niveles más bajos de sTNFR-2 ($7,009 \pm 1,646$ ng/ml) que aquellos con una actividad necroinflamatoria mayor (moderada y severa) ($8,033 \pm 2,870$ ng/ml y $10,560 \pm 4,591$ ng/ml, respectivamente) **tabla 13**.

Tabla 13: Niveles de sTNFR-2 según el grado de actividad necroinflamatoria

	HAI leve (1-4)	HAI moderada (5-8)	HAI severa (9-13)
Niveles sTNFR-2 (ng/ml)	$7,009 \pm 1,646$	$8,033 \pm 2,870$	$10,560 \pm 4,591$

Se realizó un análisis estadístico mediante el test de Kruskal-Wallis observando diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos, $p < 0,001$. **Figura 15**.

Figura 15: Niveles de sTNFR-2 según el grado de actividad necroinflamatoria



2.3.2. Análisis de los niveles de sTNFR-2 según el estadio de fibrosis

Inicialmente analizamos los niveles séricos de TNFR-2 según los distintos estadios de fibrosis como refleja la **tabla 14** y la **figura 16** observando diferencias estadísticamente significativas en los niveles séricos de TNFR-2 entre los sujetos con fibrosis avanzada (F4) si los comparamos con los demás estadios de fibrosis ($p<0,05$).

Tabla 14: Niveles de sTNFR-2 según el estadio de fibrosis hepática

Estadio de fibrosis	Sujetos (N)	Niveles séricos TNFR-2 (ng/ml)
Estadio 0	30	7,208 \pm 2,128 ng/ml
Estadio 1	45	8,893 \pm 3,578 ng/ml
Estadio 3	42	8,986 \pm 3,074 ng/ml
Estadio 4	9	15,819 \pm 5,986 ng/ml

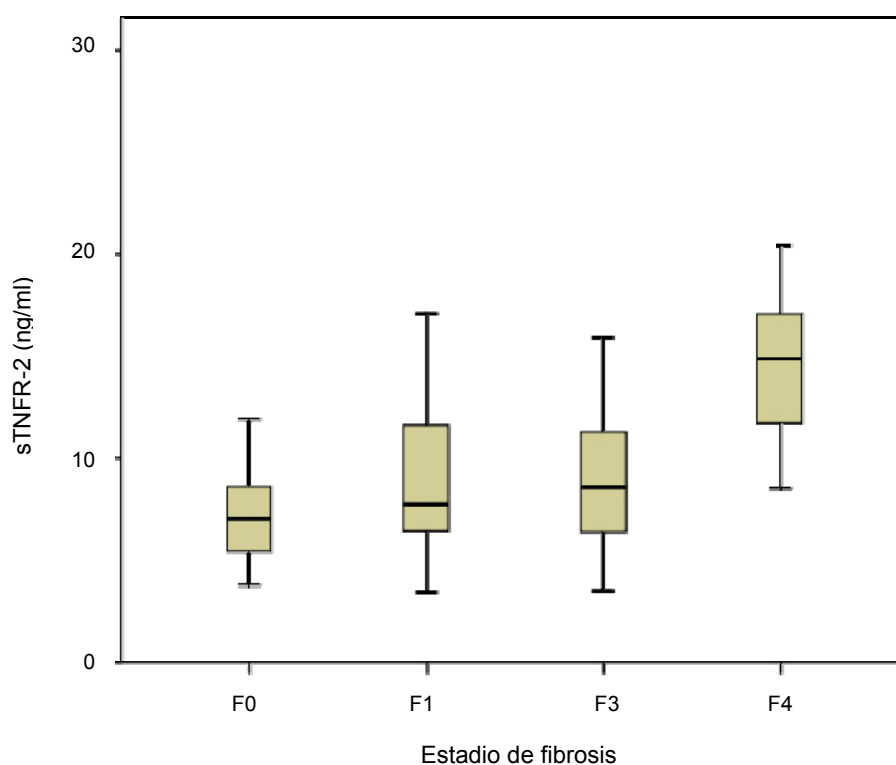


Figura 16: Niveles de sTNFR-2 según el estadio de fibrosis

Con el fin de ver la relación entre el estadio de fibrosis y los niveles séricos de TNFR-2 se agruparon los sujetos en dos categorías según el índice de Knodell de fibrosis, aquellos con un estadio de fibrosis ausente o mínima (F0 y F1) y aquellos con mayor estadio de fibrosis (F3 y F4), observando que los niveles sTNFR-2 son mayores en el grupo con mayor estadio de fibrosis ($8,219 \pm 3,174$ ng/ml vs $10,192 \pm 4,517$ ng/ml, $p:0,007$) (**figura 17**).

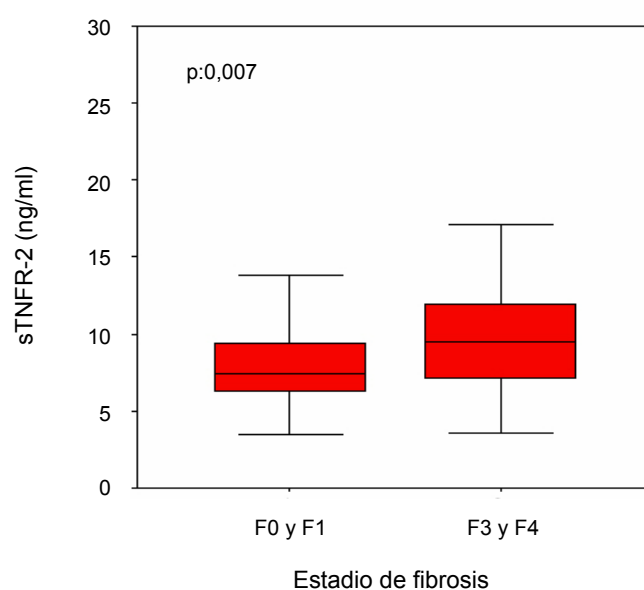


Figura 17: Niveles de sTNFR-2 según el estadio de fibrosis (F0 y F1 vs. F3 y F4)

Estas diferencias alcanzan mayor significación estadística cuando comparamos el estadio de fibrosis severa (F4) con otro grupo en el que se incluyen los otros estadios de fibrosis (F0, F1 y F3), $p<0,001$. **Figura 18**.

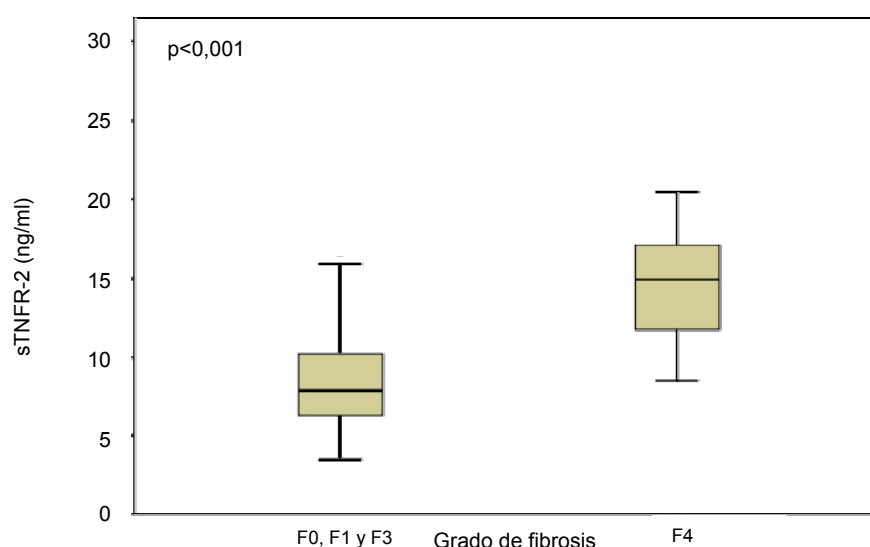


Figura 18: Niveles de sTNFR-2 según el estadio de fibrosis (F0, F1 y F3 vs. F4)

2.4. Niveles de sTNFR-2 en los pacientes que recibieron tratamiento según el grado de respuesta

De los 126 sujetos con hepatitis crónica C en los que se analizó el sTNFR-2, 90 fueron tratados con interferón pegilado y ribavirina. Mediante la U de Mann-Whitney se observa que no hay diferencias estadísticamente significativas en los niveles basales de sTNFR-2 entre los que recibieron tratamiento y los que no lo recibieron ($9,195 \pm 3,906$ ng/ml y $8,573 \pm 3,84$ ng/ml, $p:0,319$), **figura 19**.

Del grupo que recibió tratamiento antiviral, 46 (51%) presentaron respuesta bioquímica y respuesta viral sostenida, es decir, negativizaron el ARN y normalizaron sus transaminasas a los 6 meses postratamiento.

No hay diferencias estadísticamente significativas en los niveles de sTNFR-2 según el tipo de respuesta ($p:0,352$) tras aplicar el test de Kruskal-Wallis (**tabla 15**).

Tabla 15: Niveles de sTNFR-2 según el grado de respuesta al tratamiento

	Sujetos (N)	Niveles sTNFR-2 (ng/ml)	Nivel significación (p)
Respuesta viral sostenida	46	8,862 \pm 4,449 ng/ml	0,352
Fracaso primario	18	9,827 \pm 2,88 ng/ml	
Recidiva	10	8,592 \pm 1,625 ng/ml	
Retirada por efectos secundarios	16	9,819 \pm 4,325 ng/ml	

Si agrupamos los sujetos que no respondieron, es decir, fracaso primario, recidiva y retirada por efectos secundarios, y los comparamos con aquellos que presentaron una respuesta viral sostenida observamos niveles basales más bajos de sTNFR-2 en el grupo que presentó respuesta viral sostenida frente al otro grupo (8,862 \pm 4,449 ng/ml vs 9,544 \pm 3,26 ng/ml respectivamente) aunque la diferencia no alcanza significación estadística (p:0,106) tras emplear el test de la U de Mann-Whitney, **figura 20**.

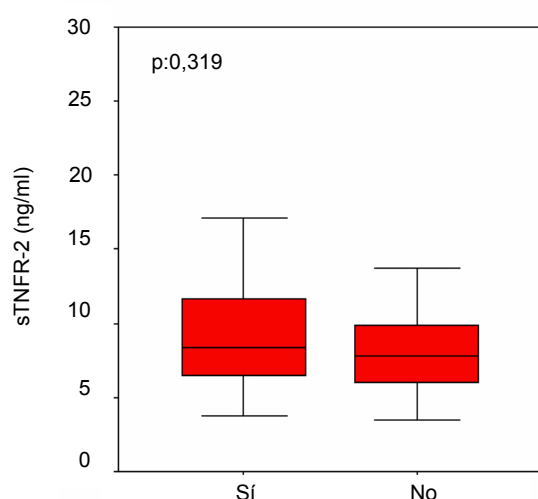


Figura 19: Niveles de sTNFR-2 entre los que recibieron tratamiento y los que no

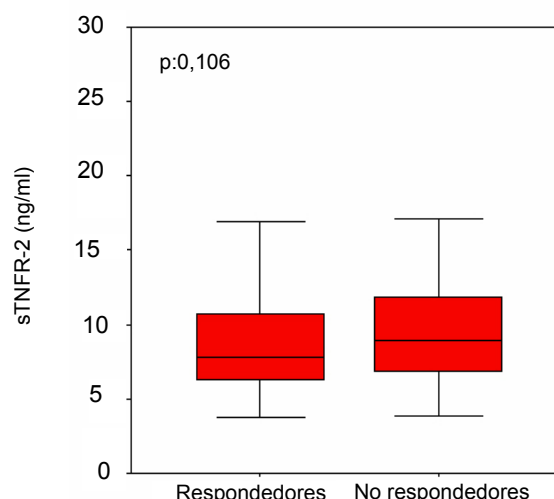


Figura 20: Niveles de sTNFR-2 entre los que respondieron al tratamiento y los que no

3. Análisis de los niveles séricos de TGFβ₁

De los 127 pacientes incluidos, se ha realizado análisis de los niveles séricos de TGFβ₁ en 66 pacientes de acuerdo con las disponibilidades del kit.

3.1. Comparación entre casos y controles

Los pacientes con hepatitis crónica C muestran niveles séricos de TGFβ₁ más bajos que los controles (31778,30±10817,93 pg/ml vs 44285,5±8910,22 pg/ml, respectivamente). Tras realizar comparaciones de medias se observan diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos, $p < 0,05$. **Tabla 16.**

Tabla 16: Niveles séricos de TGFβ₁ en sujetos con hepatitis crónica C y controles

	Niveles de TGFβ ₁ (pg/ml)	Nivel significación (p)
Casos (n:66)	31778,30±10817,93 pg/ml	<0,05
Controles (n:6)	44285,5±8910,22 pg/ml	

3.2. Análisis de los niveles de TGFβ₁ sérico frente a parámetros bioquímicos

Para estudiar cómo se comporta el TGFβ₁ frente a los parámetros bioquímicos analizamos las correlaciones entre las distintas variables a estudio y el TGFβ₁ sérico. En la **tabla 17** se muestran las distintas correlaciones estudiadas así como su grado de significación.

Tabla 17: Correlaciones entre los parámetros bioquímicos y el TGF β_1 sérico

Parámetros bioquímicos	Rho de Spearman (rho)	Nivel significación (p)
AST	-0,14	0,261
ALT	-0,08	0,525
GGT	0,29	0,82
FA	0,095	0,452
Plaquetas	0,459*	<0,001
Albúmina	0,325	0,074
Sideremia	-0,124	0,385
Bilirrubina	-0,172	0,182
INR	-0,118	0,413
T. Protrombina	0,003	0,984

r de Pearson *. Véase también figura 28 a

Como se indica en la tabla sólo se ha observado una correlación positiva estadísticamente significativa entre los niveles séricos de TGF β_1 y la cifra de plaquetas (r: 0,459, p: <0,001).

3.3. Análisis de los niveles de TGF β_1 sérico frente a parámetros histológicos

Los niveles séricos de TGF β_1 muestran correlación negativa tanto con el grado de actividad necroinflamatoria (rho: -0,074, p:0,577) como con el estadio de fibrosis hepática (rho: -0,345) pero alcanzan significación estadística solamente en el último caso, p<0,001.

3.3.1. Análisis de los niveles de $\text{TGF}\beta_1$ según el grado de actividad necroinflamatoria

No se observan diferencias estadísticamente significativas (ANOVA, p : 0.953) en los niveles séricos basales de $\text{TGF}\beta_1$ entre los sujetos con actividad necroinflamatoria leve (1-4 puntos) (8 sujetos), moderada (5-8 puntos) (22 sujetos) o severa (9-13 puntos) (36 sujetos), **tabla 18** y **figura 21**.

Tabla 18: Niveles séricos de $\text{TGF}\beta_1$ según el grado de actividad necroinflamatoria

Actividad necroinflamatoria	Niveles séricos $\text{TGF}\beta_1$ (pg/ml)	Nivel significación (p)
Leve (n:8)	$31940,38 \pm 7153,45$	0,953
Moderada (n:22)	$31186,64 \pm 8061,82$	
Severa (n:36)	$32103,86 \pm 12952,67$	

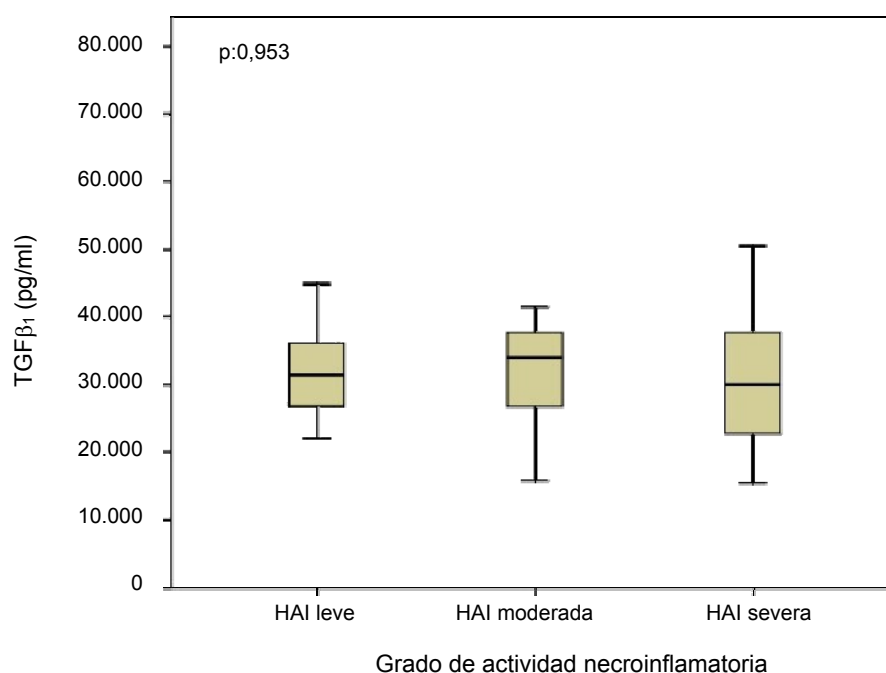


Figura 21: Niveles séricos de $\text{TGF}\beta_1$ según el grado de actividad necroinflamatoria

3.3.2. Análisis de los niveles de $\text{TGF}\beta_1$ según el estadio de fibrosis

Al analizar las diferencias de medias entre los niveles séricos de $\text{TGF}\beta_1$ entre los distintos estadios de fibrosis hepática, se observa que sólo hay diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los sujetos con fibrosis 0 y 4, **tabla 19** y **figura 22**.

Tabla 19: Niveles séricos de $\text{TGF}\beta_1$ según el estadio de fibrosis hepática

Estadio de fibrosis	Sujetos (N)	Niveles séricos $\text{TGF}\beta_1$ (pg/ml)
Estadio 0	15	34833,33 \pm 5168,43 pg/ml
Estadio 1	16	31352,5 \pm 8744,25 pg/ml
Estadio 3	28	32994,68 \pm 13775,36 pg/ml
Estadio 4	7	21339,57 \pm 1594,74 pg/ml

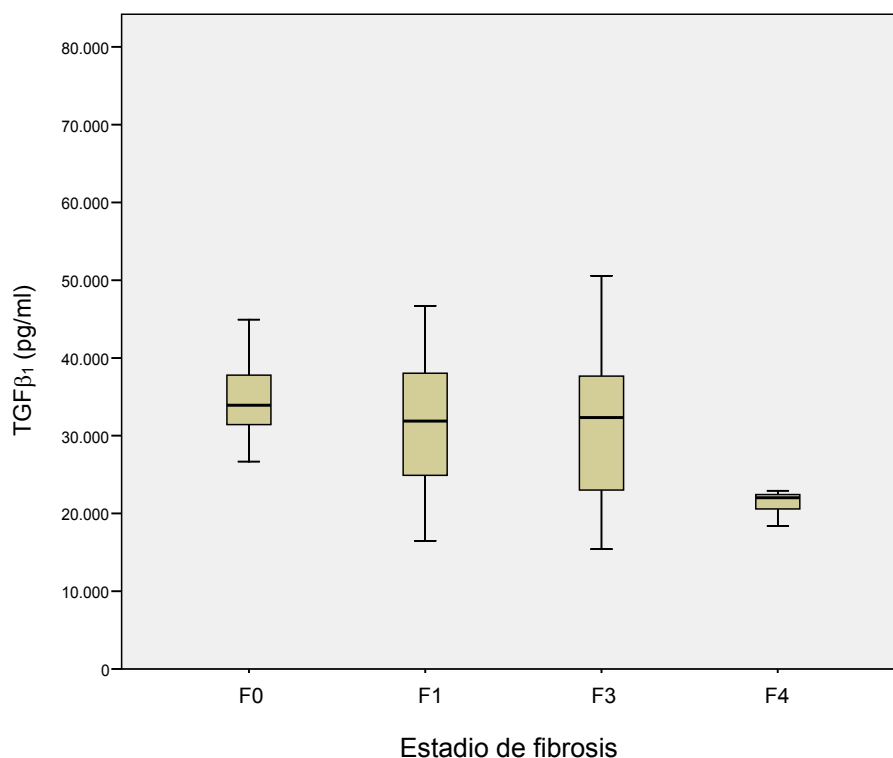


Figura 22: Niveles séricos de $\text{TGF}\beta_1$ según el estadio de fibrosis

En un segundo tiempo, se divide a los pacientes en dos categorías de fibrosis, los que presentan fibrosis ausente-mínima (F0 y F1) y los que presentan una fibrosis moderada-severa (F3 y F4). No existen diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos en la concentración de $\text{TGF}\beta_1$ ($33036,77 \pm 7336,46$ pg/ml vs $30663,66 \pm 131722,50$ pg/ml respectivamente, $p:0,363$), **figura 23**.

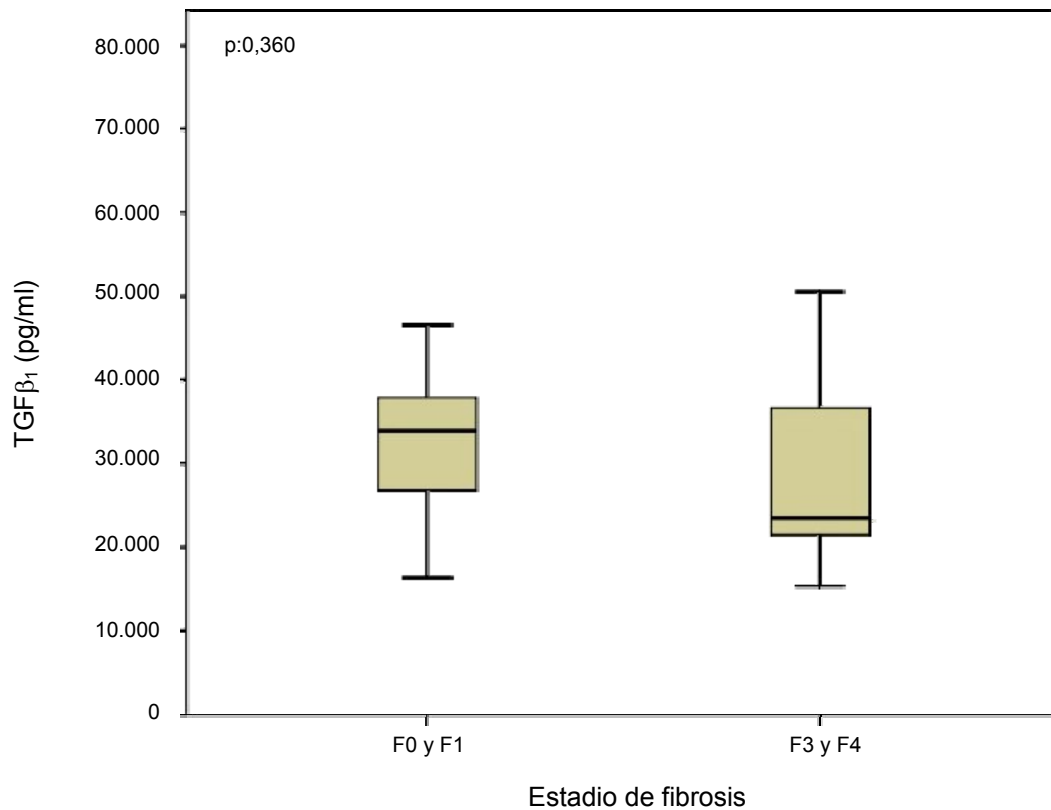


Figura 23: Niveles séricos de $\text{TGF}\beta_1$ según el estadio de fibrosis (F0 y F1 vs F3 y F4)

Posteriormente, se comparan los niveles séricos de $\text{TGF}\beta_1$ de los pacientes que no alcanzan el estadio máximo de fibrosis (F0, F1 y F3) con los que tienen fibrosis severa (F4), observándose diferencia significativa ($21339,57 \pm 1594,74$ vs $33016,80 \pm 10778,54$, $p < 0,001$), **figura 24**.

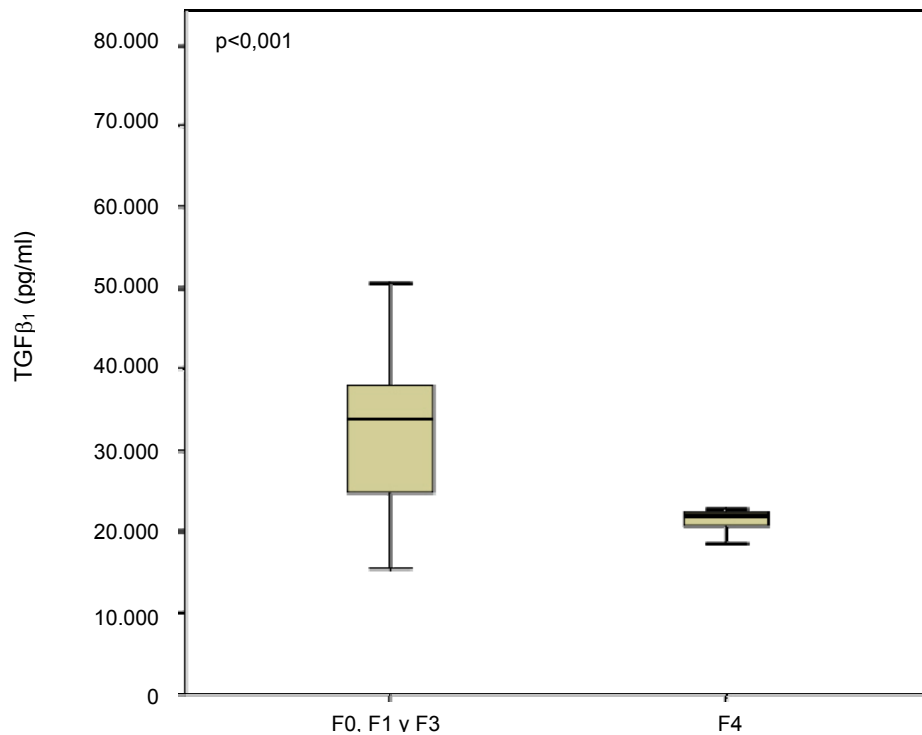


Figura 24: Niveles séricos de TGFβ₁ según el estadio de fibrosis (F0, F1 y F3 vs F4)

3.4. Niveles séricos de TGFβ₁ en los pacientes que recibieron tratamiento según el grado de respuesta

De los 66 con hepatitis crónica C en los que se analizó el TGFβ₁ sérico, 45 fueron tratados con interferón pegilado y ribavirina. No se aprecian diferencias estadísticamente significativas en los niveles basales séricos de TGFβ₁ entre los que recibieron y los que no recibieron tratamiento ($31965,93 \pm 10598,49$ pg/ml vs $31376,24 \pm 11531,23$ pg/ml, $p:0,838$), **figura 25**.

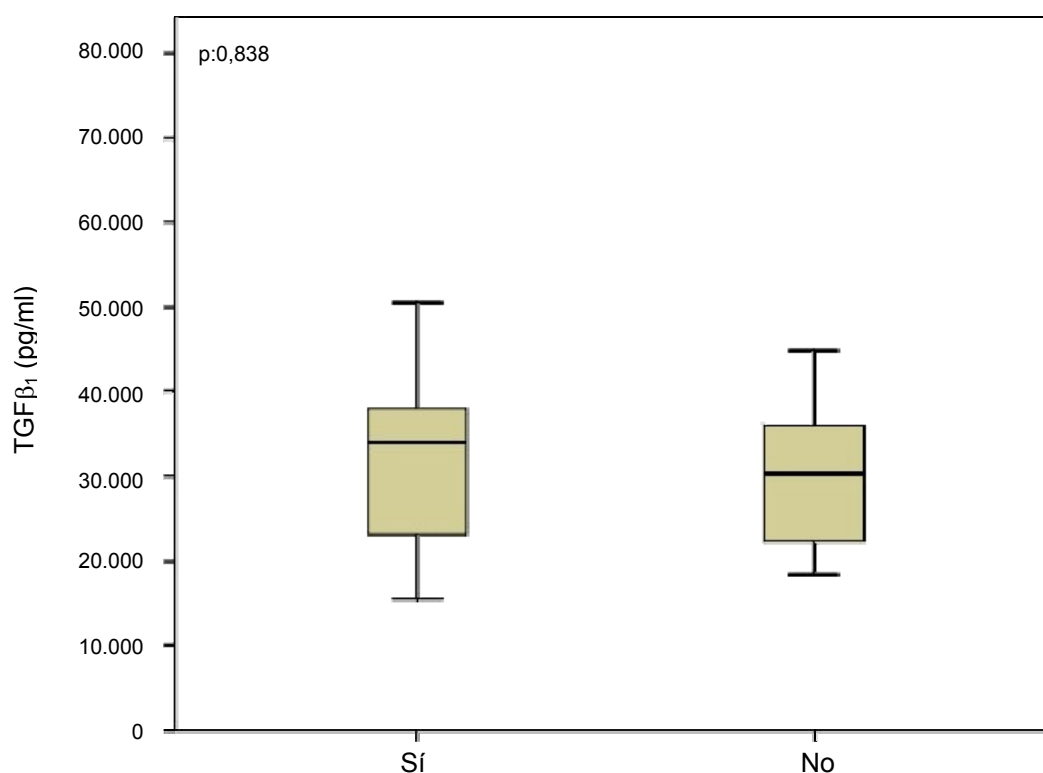


Figura 25: Niveles séricos de TGFβ₁ entre los que recibieron tratamiento y los que no

Del grupo que recibió tratamiento, 18 sujetos (40%) presentaron respuesta bioquímica y viral sostenida, es decir, negativizaron el ARN y normalizaron sus transaminasas a los 6 meses postratamiento, **tabla 20**.

Tabla 20: Niveles séricos de TGFβ₁ según el grado de respuesta al tratamiento

	Sujetos (N)	Niveles de TGFβ ₁ (pg/ml)	Nivel significación (p)
Respuesta viral sostenida	18	34689,6 ±12604,1 pg/ml	0,499
Fracaso primario	15	29964,6 ±10075,5 pg/ml	
Recidiva	4	33287,3 ±6550,5 pg/ml	
Retirada por efectos secundarios	8	28929,6 ±7722,5 pg/ml	

Tras agrupar los sujetos que no respondieron al tratamiento (fracaso primario, recidiva y retirada por efectos secundarios) y los compararlos con aquellos que presentaron una respuesta viral sostenida, no se observan diferencias significativas ($30150,2 \pm 8812,6$ pg/ml vs $34689,6 \pm 12604,1$ pg/ml, $p:0,162$, **figura 26**.

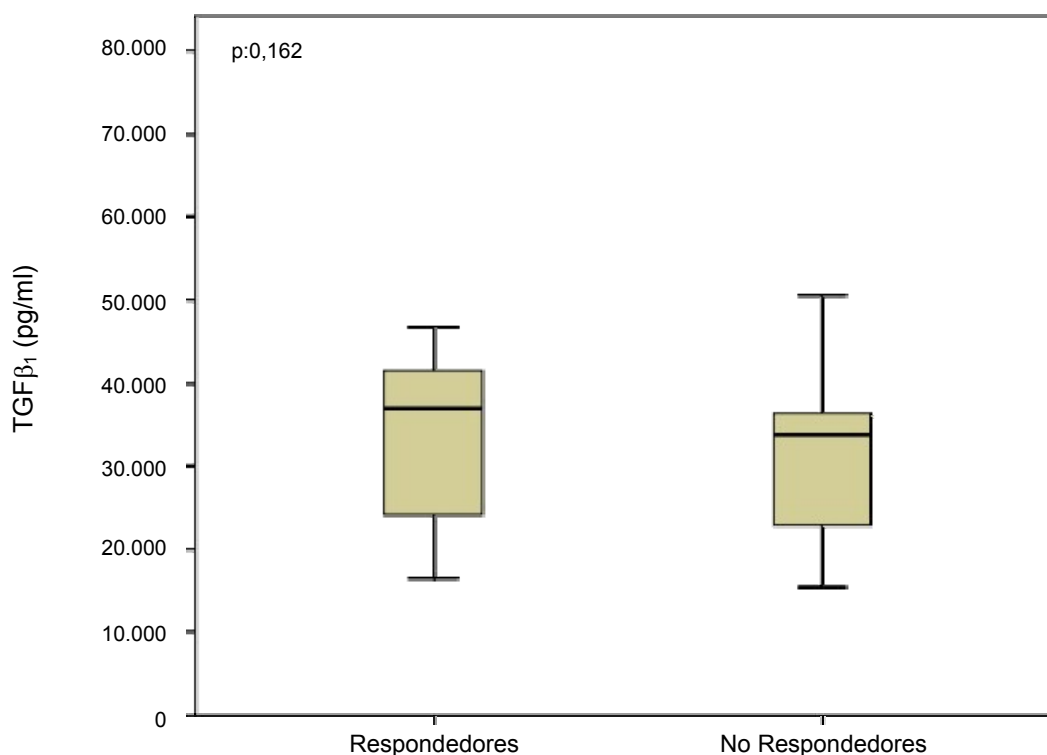


Figura 26: Niveles séricos de TGFβ₁ entre los que respondieron al tratamiento y los que no

4. Análisis de los niveles tisulares de TGFβ₁

De los 127 pacientes incluidos, se ha realizado análisis de los niveles tisulares de TGFβ₁ en 44 pacientes de acuerdo con las disponibilidades del kit. Los niveles tisulares medios de TGFβ₁ en los pacientes estudiados son $26,30 \pm 13,34\%$.

4.1. Análisis niveles tisulares de $\text{TGF}\beta_1$ frente a parámetros bioquímicos

Se realizan correlaciones del $\text{TGF}\beta_1$ tisular con los distintos parámetros bioquímicos en estudio que se muestran en la **tabla 21**.

En la **figura 27** se representa la relación entre los niveles séricos de las transaminasas con los niveles tisulares de $\text{TGF}\beta_1$, y en la **figura 28** se representa la relación tanto de los niveles tisulares como séricos de $\text{TGF}\beta_1$ con las plaquetas en la que se puede ver una relación inversa.

Tabla 21: Correlaciones entre los parámetros bioquímicos y el $\text{TGF}\beta_1$ tisular

Parámetros bioquímicos	Rho de Spearman (rho)	Nivel significación (p)
AST	0,513	<0,001
ALT	0,483	<0,001
GGT	0,147	0,342
FA	0,434	0,004
Plaquetas	-0,394*	0,008
Albúmina	-0,193	0,378
Sideremia	-0,309	0,097
Bilirrubina	0,357	0,024
INR	0,163	0,5
T. Protrombina	0,104	0,53

r de Pearson *

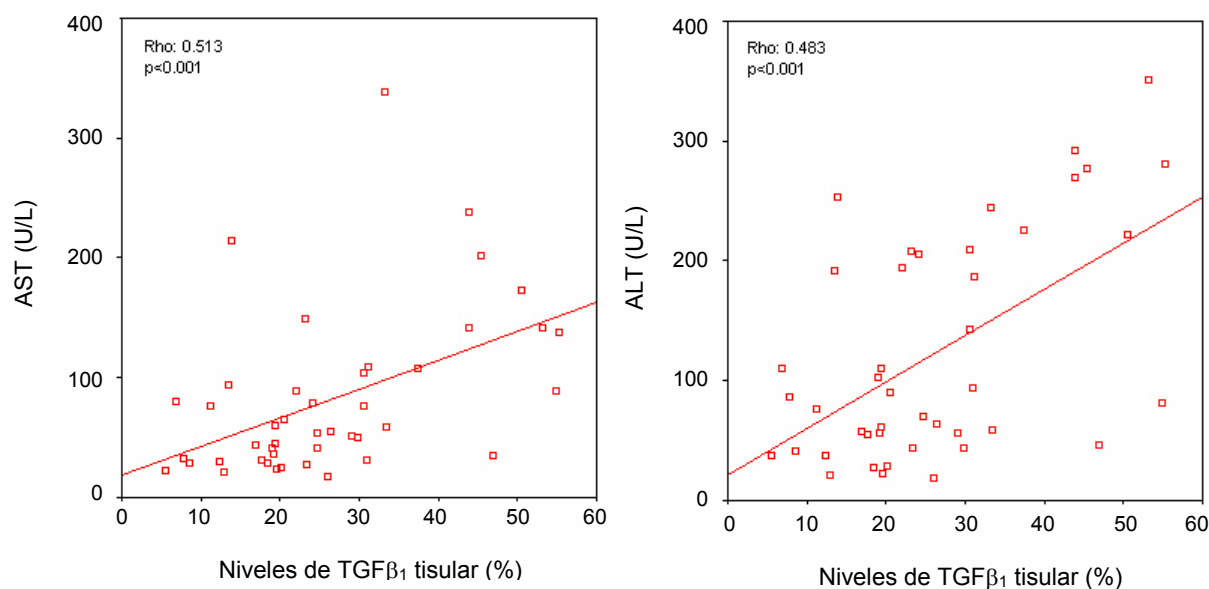


Figura 27: Correlación entre los niveles tisulares de TGFβ₁ y las transaminasas (AST, ALT)

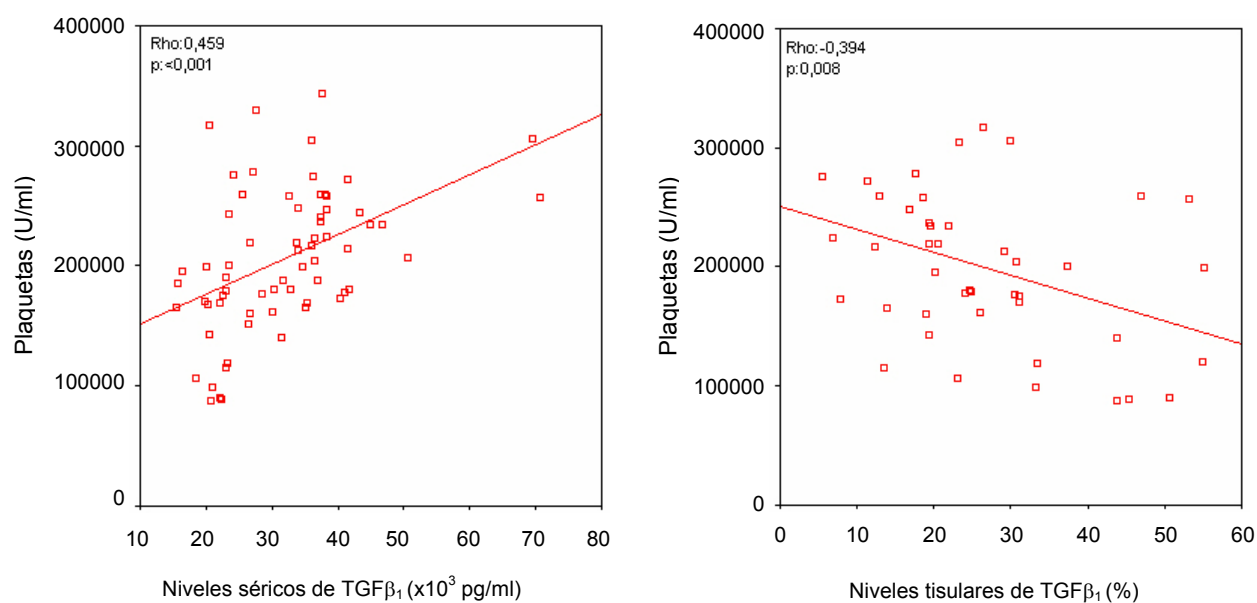


Figura 28: Correlación entre la cifra de plaquetas con los niveles séricos y tisulares de TGFβ₁

4.2. Análisis TGF β_1 tisular frente a parámetros histológicos

Los niveles tisulares de TGF β_1 muestran una correlación positiva significativa con el grado de actividad necroinflamatoria (rho:0,456, p:0,002) y con el estadio de fibrosis hepática (rho:0,585, p<0,001).

4.2.1. Análisis de los niveles de TGF β_1 tisular según el grado de actividad necroinflamatoria

En nuestro estudio, los niveles tisulares de TGF β_1 son superiores en los sujetos con mayor grado de actividad necroinflamatoria con una correlación significativa cuando se analiza la correlación con los valores individuales del grado necroinflamatorio en el índice de Knodell (rho: 0,456, p: 0,002), pero no se observan diferencias estadísticamente significativas (p:0,094) con el test de ANOVA al clasificar a los sujetos en tres categorías de actividad necroinflamatoria (leve, moderada y severa), **tabla 22 y figura 29**.

Tabla 22: Niveles tisulares de TGF β_1 según el grado de actividad necroinflamatoria

Grado de actividad necroinflamatoria	Niveles tisulares TGF β_1 (%)	Nivel significación (p)
Leve (n:5)	18,536 \pm 4,386	0,094
Moderada (n:14)	22,539 \pm 13,359	
Severa (n:25)	29,956 \pm 13,572	

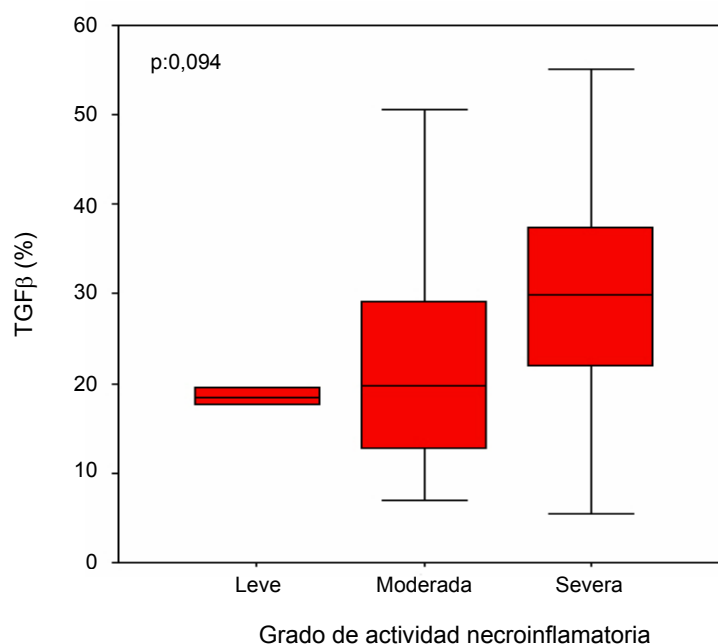


Figura 29: Niveles tisulares de TGFβ₁ según el grado de actividad necroinflamatoria

4.2.2. Análisis de los niveles de TGFβ₁ tisular según el estadio de fibrosis

A mayor grado de fibrosis en la biopsia hepática, los niveles tisulares de TGFβ₁ observados son significativamente más elevados ($p < 0,001$) en los sujetos con fibrosis avanzada (F3 y F4) que en los sujetos con fibrosis nula o leve (F0 y F1), **tabla 23 y figura 30**.

Tabla 23: Niveles tisulares de TGFβ₁ según el estadio de fibrosis hepática

Estadio de fibrosis	Sujetos (N)	Niveles tisulares TGFβ ₁ (%)
Estadio 0	13	19,009±5,87
Estadio 1	8	14,254±6,86
Estadio 3	14	34,359±11,701
Estadio 4	9	34,996±14,52

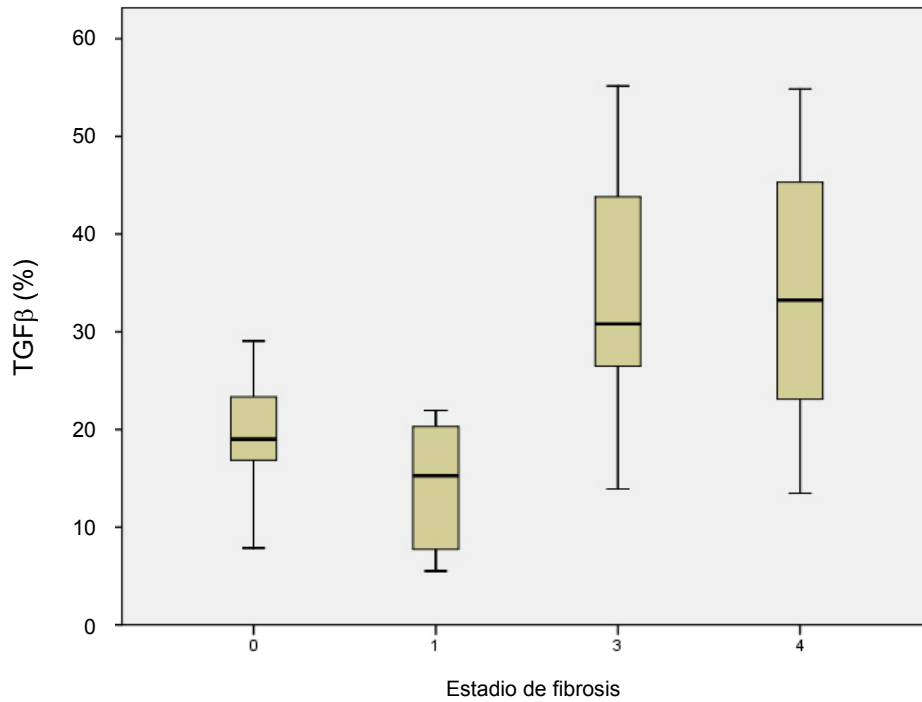


Figura 30: Niveles tisulares de $TGF\beta_1$ según el estadio de fibrosis

Al comparar los niveles tisulares de $TGF\beta_1$ entre los sujetos con fibrosis ausente y mínima (F0 y F1) con aquellos que muestran un mayor estadio de fibrosis (F3 y F4) se observa que son menores en el grupo de menor fibrosis ($17,198 \pm 6,538$ vs $34,608 \pm 12,557$, $p < 0,001$), **figura 31**.

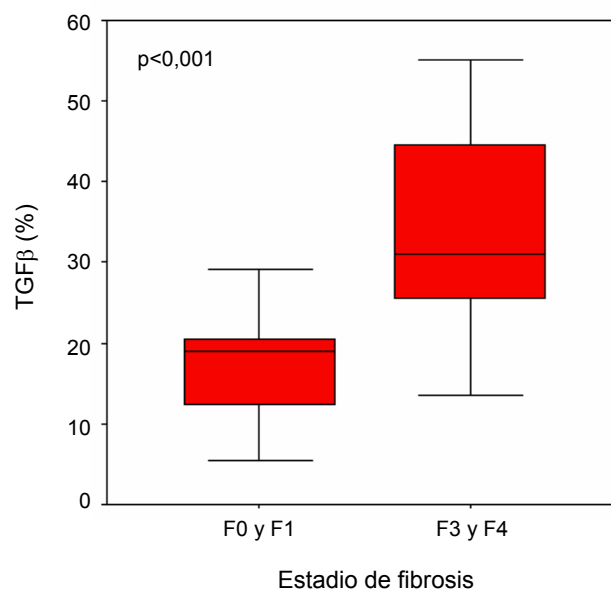


Figura 31: Niveles tisulares de $TGF\beta_1$ según el estadio de fibrosis (F0yF1 vs F3yF4)

Al comparar los niveles séricos de $\text{TGF}\beta_1$ de los pacientes con fibrosis severa (F4) con otro grupo en el que se incluyen los sujetos con los otros estadios de fibrosis (F0, F1 y F3), no se aprecian diferencias significativas ($34,995 \pm 14,520$ vs $24,062 \pm 12,257$, con $p: 0,062$), **figura 32**.

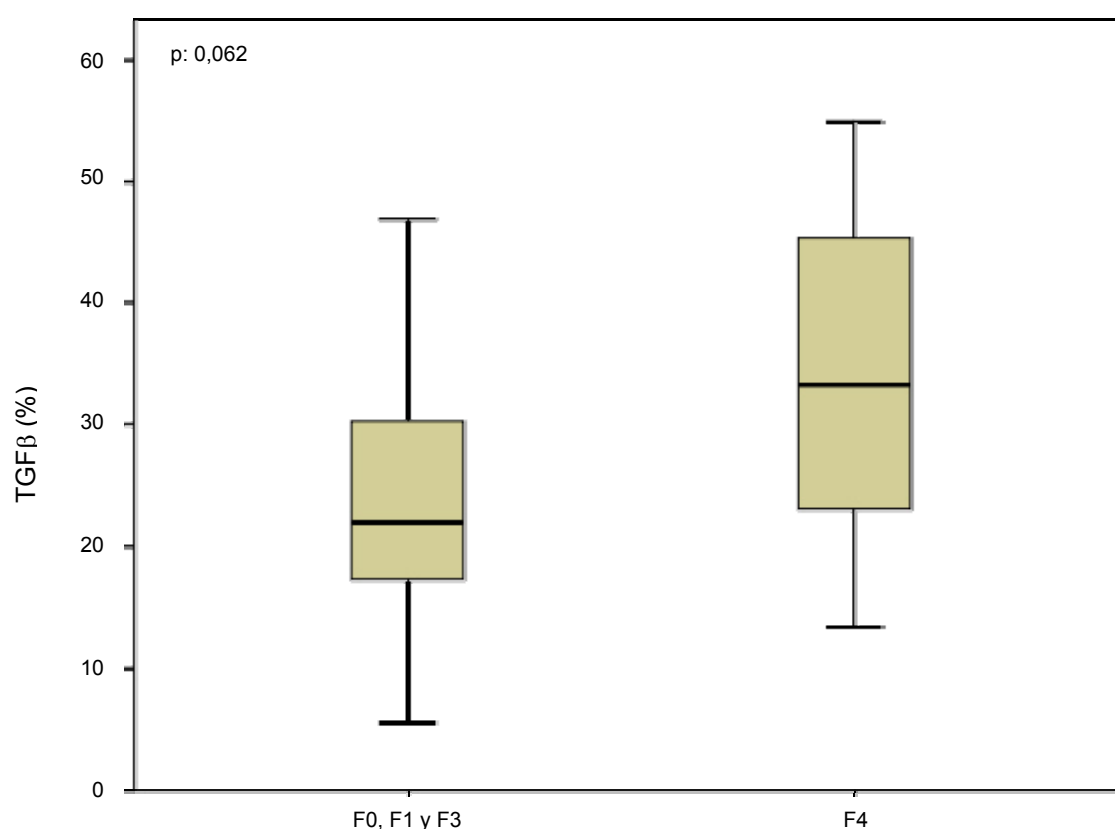


Figura 32: Niveles tisulares de $\text{TGF}\beta_1$ según el estadio de fibrosis (F0,F1 y F3 vs F4)

4.3. Niveles tisulares de $\text{TGF}\beta_1$ en los pacientes que recibieron tratamiento según el grado de respuesta

De los 44 pacientes con hepatitis crónica C en los que se analizó el $\text{TGF}\beta_1$ tisular, 28 fueron tratados con interferón pegilado y ribavirina. No hay diferencias estadísticamente significativas en los niveles basales tisulares de $\text{TGF}\beta_1$ entre los que recibieron y los que

no recibieron tratamiento ($26,411 \pm 14,296$ % vs $26,102 \pm 11,922$ % respectivamente, $p:0,942$), **figura 33**.

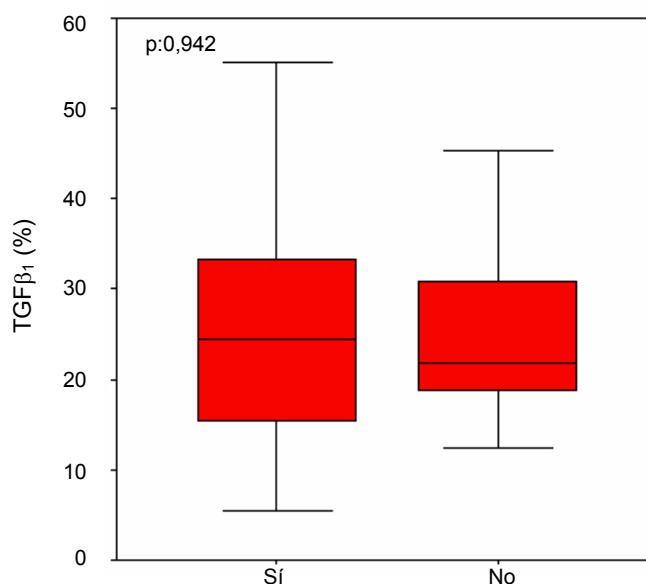


Figura 33: Niveles tisulares de TGFβ₁ entre los que recibieron tratamiento y los que no

Tabla 24: Niveles tisulares de TGFβ₁ según el grado de respuesta al tratamiento

	Sujetos (N)	Niveles TGFβ ₁ (%)	Nivel significación (p)
Respuesta viral sostenida	9	$22,084 \pm 12,764$	0,694
Fracaso primario	9	$27,724 \pm 15,085$	
Recidiva	2	$34 \pm 4,822$	
Retirada por efectos secundarios	8	$27,904 \pm 17,13$	

Del grupo que recibió tratamiento, 9 sujetos (32,14%) presentaron respuesta bioquímica y viral sostenida, es decir, negativizaron el ARN y normalizaron sus transaminasas a los 6 meses postratamiento. No se observan diferencias estadísticamente significativas en

los niveles tisulares de $\text{TGF}\beta_1$ pretratamiento entre los respondedores y no respondedores (t de Student, p: 0,279), **figura 34**.

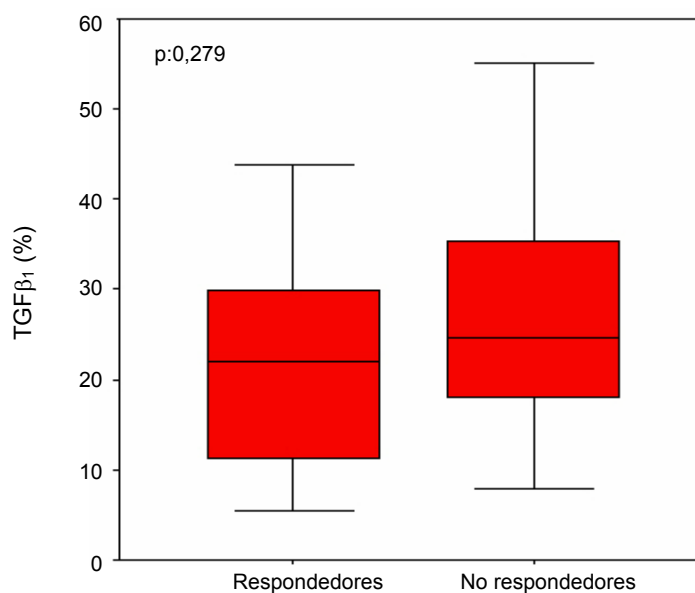


Figura 34: Niveles tisulares de $\text{TGF}\beta_1$ entre los que respondieron al tratamiento y los que no

5. Otras correlaciones

5.1. Correlación entre las transaminasas y el grado de actividad histológica

Se observa correlación positiva significativa entre las cifras de transaminasas (AST, ALT) con el grado de actividad necroinflamatoria (**figuras 35 y 36**) y con el estadio de fibrosis (**figuras 37 y 38**).

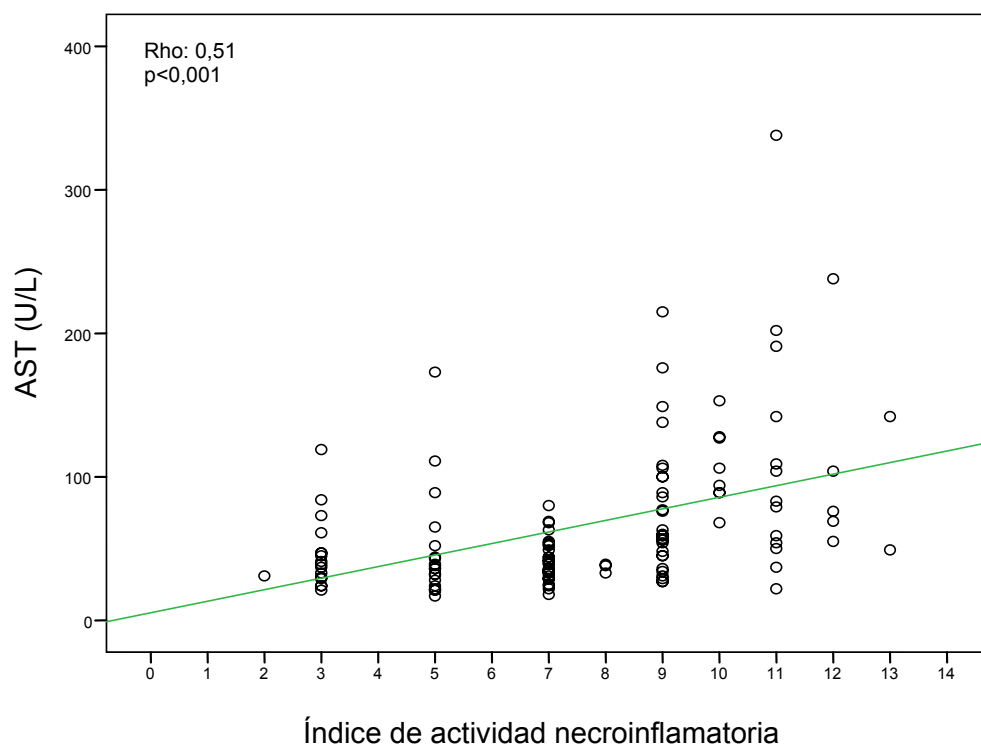


Figura 35: Correlación entre los niveles séricos de AST y el grado de actividad necroinflamatoria

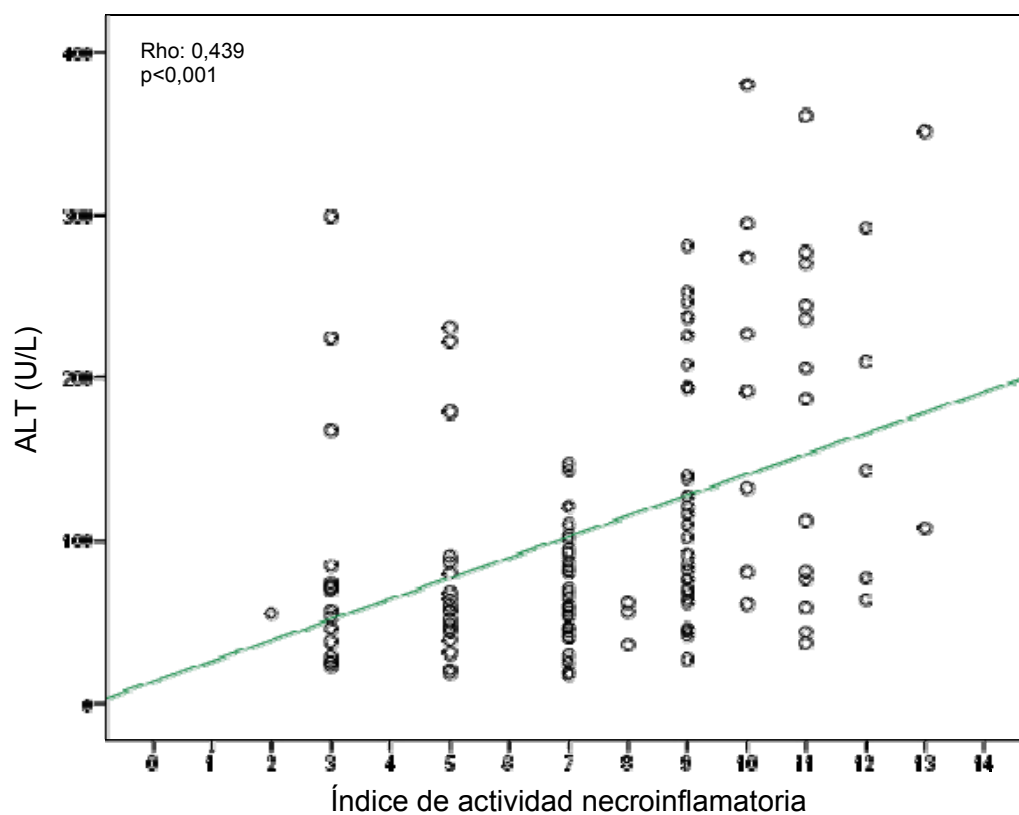


Figura 36: Correlación entre los niveles séricos de ALT y el grado de actividad necroinflamatoria

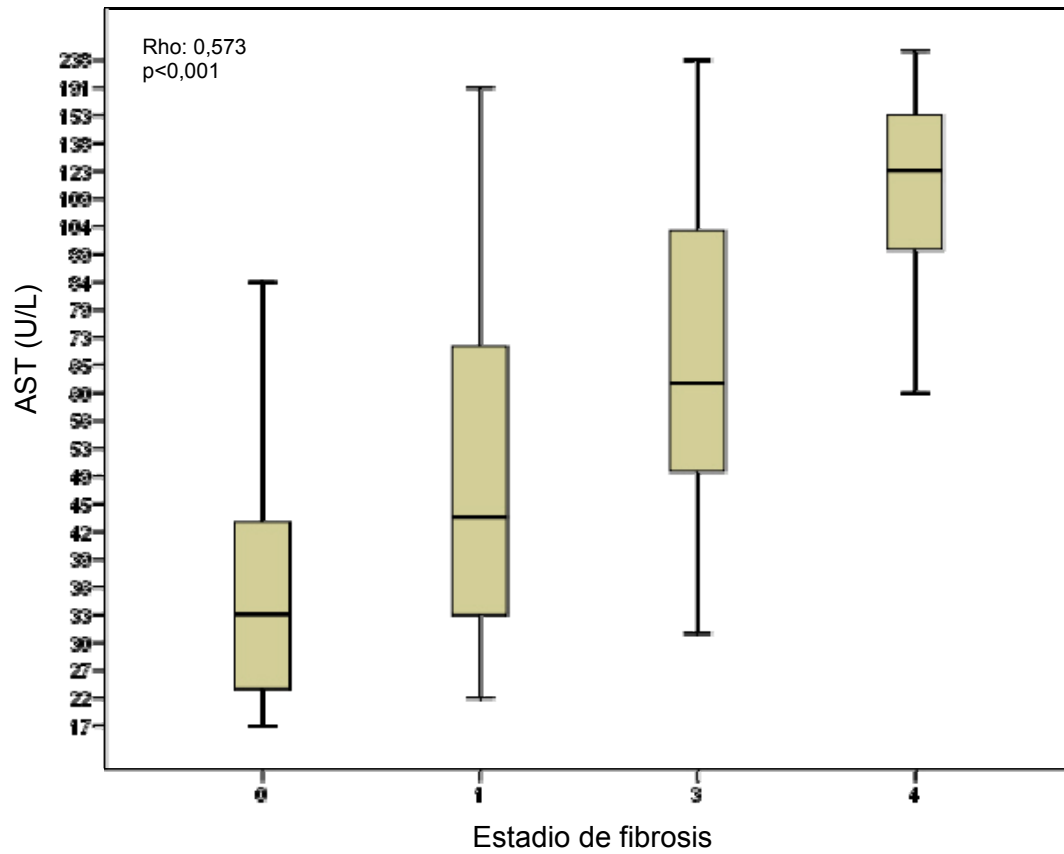


Figura 37: Niveles séricos de AST según el estadio de fibrosis

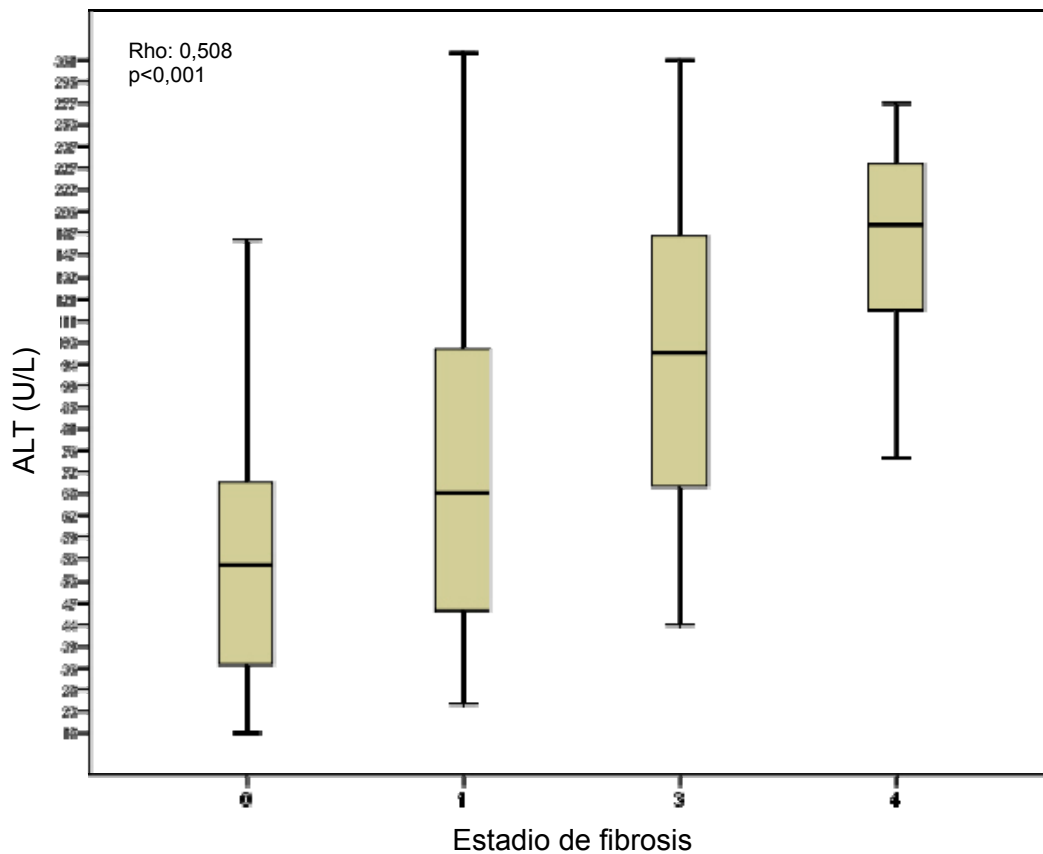


Figura 38: Niveles séricos de ALT y el estadio de fibrosis

5.2. Correlación entre los niveles séricos y tisulares de $TGF\beta_1$

Si correlacionamos ambas variables a estudio, observamos que presentan una débil correlación negativa (ρ : -0,17) pero sin alcanzar significación estadística.

DISCUSIÓN

Nuestros resultados confirman el hecho bien conocido de que en los pacientes con hepatitis crónica C existe una correlación positiva entre la cifra de transaminasas (AST, ALT) y el grado de actividad inflamatoria (McCormick SE y cols. 1996) y el estadio de fibrosis en la biopsia hepática, por lo que en cierta manera las cifras de transaminasas podrían ser un marcador indirecto del grado de afectación hepática, aunque muy imperfecto y poco útil clínicamente.

Las citocinas juegan un papel importante en las respuestas inflamatorias y de inmunidad. A pesar de su importancia, queda mucho por conocer sobre el papel de las mismas en la hepatitis crónica C. A continuación comentaremos los principales hallazgos de nuestro estudio en relación con los comunicados por otros grupos y según los objetivos planteados.

1. Significado de los niveles plasmáticos del TNFR-2

Partimos de la base de que el TNFR-2 en plasma es un reflejo estable y más fiable que los niveles de $\text{TNF}\alpha$ para valorar la producción tisular de esta citocina (Crespo J y cols. 2002). Hemos considerado que los argumentos aducidos por estos autores eran suficientes para adoptar esta determinación en lugar de la de los niveles plasmáticos de $\text{TNF}\alpha$.

Nuestros resultados avalan los expuestos con anterioridad por otros autores así como nuestra hipótesis de trabajo, dado que se observan niveles más elevados de sTNFR-2 en los pacientes con hepatitis crónica C que en los controles sanos y que éstos guardan una correlación positiva con el grado de actividad necroinflamatoria (Verma V y cols. 2008). Además, al igual que lo observado por Itoh Y y cols. en 1999, los niveles séricos de TNFR-2 guardan correlaciones positivas significativas con los parámetros bioquímicos de necroinflamación, especialmente con las

transaminasas (ALT, AST) y en menor grado con la GGT, que es un marcador más ambiguo ya que, refleja también colestasis así como daño hepático de una manera más global. Además, en nuestro trabajo también se observa una correlación inversa con la cifra de plaquetas, más difícil de interpretar dado que el descenso en la cifra de plaquetas no es un marcador de inflamación sino que clásicamente se considera un reflejo indirecto del grado de hipertensión portal en los casos de fibrosis avanzada. No obstante, esta equiparación parece algo simplista a la vista de datos recientes que indican que la trombopenia de las hepatopatías crónicas depende no sólo de la hipertensión portal y el hiperesplenismo secundario a la congestión pasiva del bazo, sino también de un posible descenso de su producción y de una destrucción extraesplénica de naturaleza inmune (Witters P y cols. 2008). Concretamente, en la cirrosis hepática se ha detectado una menor producción así como unos niveles plasmáticos disminuidos de trombopoyetina, principal factor de crecimiento involucrado en la trombopoyesis, que es producido fundamentalmente por el hígado (Martín TG y cols. 1997).

En relación con los datos de fibrosis en la biopsia hepática, también se han observado unos niveles séricos de TNFR-2 más elevados en los pacientes con hepatitis crónica C con estadios de fibrosis más avanzados.

No existen diferencias estadísticamente significativas en cuanto a los niveles séricos de TNFR-2 previos al tratamiento entre los pacientes que presentaron respuesta virológica sostenida y los que no respondieron al tratamiento. Por lo tanto no podemos considerar esta determinación como un criterio basal predictor de respuesta al tratamiento.

2. Significado de los niveles séricos de TGF β_1

La fibrosis hepática se desarrolla porque existe un depósito aumentado de proteínas de la matriz extracelular como resultado de un desequilibrio entre la existencia de una fibrogénesis aumentada y un descenso de la fibrolisis (Friedman SL. 1993). Entre los mediadores profibróticos, el TGF β_1 es el mejor caracterizado.

Se ha señalado que los niveles séricos de TGF β_1 pueden estar en relación con el estadio de fibrosis hepática en los pacientes con hepatitis crónica C independientemente del grado de actividad necroinflamatoria (Neuman MG y cols., 2002, Janczewska-Kazek E y cols. 2006).

En nuestro trabajo, hemos observado unos niveles séricos de TGF β_1 elevados en los sujetos con hepatitis crónica C en comparación con los sujetos sanos. Además se ha observado una correlación positiva entre la cifra de plaquetas y los niveles séricos de TGF β_1 . Datos recientes indican que las plaquetas producen TGF β_1 (Anitua E y cols. 2007), lo que podría explicar esta correlación.

En cuanto a la relación de los niveles séricos de TGF β_1 y el estadio de fibrosis, Neuman MG y cols. (2007) comprobaron que existe un aumento de los mismos hasta el estadio F3 de fibrosis (de acuerdo con la puntuación de Knodell RG y cols. 1981). Sin embargo, esta tendencia se invertía al considerar los niveles de TGF β_1 en los pacientes con fibrosis estadio 4 (cirrosis hepática), en los que estas concentraciones eran menores que las detectadas en los estadios iniciales (0 y 1) de fibrosis.

Nuestros resultados confirman los previamente comentados, es decir, los niveles de $\text{TGF}\beta_1$ son más bajos en los sujetos con el máximo grado de fibrosis, lo que podría reflejar la existencia de un *feed-back* negativo: el incremento del depósito de colágena en el hígado inhibe la síntesis o la liberación de $\text{TGF}\beta_1$ (o ambas) por un mecanismo que actualmente no podemos aventurar. También es posible que colabore la disminución del número de plaquetas, posible fuente secundaria de $\text{TGF}\beta_1$ (Anitua E y cols, 2007), que acompaña a la fibrosis avanzada.

3. Significado de los niveles hepáticos de $\text{TGF}\beta_1$

La inflamación hepática inducida por la infección por VHC estimula la producción de $\text{TGF}\beta_1$ tisular, como apoyan los hallazgos de nuestro estudio, en el que hemos observado una correlación directa de $\text{TGF}\beta_1$ con los parámetros bioquímicos que reflejan necroinflamación, como son las transaminasas (AST, ALT), e inversa con la cifra de plaquetas, marcador indirecto de fibrosis hepática en la hepatitis C.

En lo que se refiere a los niveles tisulares de $\text{TGF}\beta_1$, se observa un aumento de los mismos conforme aumenta la fibrosis hepática, lo que concuerda en parte con lo publicado hasta el momento por Neuman MG y cols. en 2007. Estos autores han observado que la intensidad de tinción del $\text{TGF}\beta_1$ en tejido hepático se correlaciona positivamente con la fibrosis en pacientes no cirróticos pero es negativa ($r : -0,30$) en pacientes cirróticos. Este aspecto no es corroborado en nuestro estudio, ya que los niveles tisulares de $\text{TGF}\beta_1$ en los estadios F3 y F4 son prácticamente idénticos. Hay que señalar, sin embargo, que el número de enfermos cirróticos en nuestra serie es pequeño (9 casos), debido a que la indicación de biopsia hepática es restringida en enfermos en los que los datos del estudio clínico habitual son sugerentes o claramente indicativos de cirrosis, por obvias razones éticas.

Como cabe suponer a la vista de lo anteriormente expuesto, hemos comprobado que los niveles séricos y tisulares de $\text{TGF}\beta_1$ guardan una relación inversa débil sin alcanzar significación estadística. Aunque este hallazgo puede parecer paradójico en un primer análisis, cabría explicarlo porque en fases iniciales del daño y la inflamación tisulares aumentaría la producción de $\text{TGF}\beta_1$ y su paso a la sangre, mientras que cuando ya se ha producido un aumento significativo de la matriz extracelular y establecido una fibrosis hepática avanzada, se inhibe la liberación y/o la síntesis de $\text{TGF}\beta_1$ por el hígado.

CONCLUSIONES

1. El TNFR-2 sérico puede ser un buen marcador indirecto de actividad necroinflamatoria en la hepatitis crónica por VHC dado que guarda una buena correlación tanto con los marcadores séricos como con el grado de actividad necroinflamatoria hepática.
2. La concentración sérica de $\text{TGF}\beta_1$ en la hepatitis crónica por VHC aumenta conforme lo hace el estadio de fibrosis, pero sólo hasta fases moderadamente avanzadas de la misma, lo que sugiere que $\text{TGF}\beta_1$ juega un papel importante sobre todo en las fases iniciales de la fibrogénesis hepática.
3. El descenso de los niveles de $\text{TGF}\beta_1$ sérico en la hepatitis crónica por VHC con fibrosis hepática avanzada (cirrosis) sugiere que esta citocina deja de intervenir de forma significativa en estadios avanzados.
4. La importancia de $\text{TGF}\beta_1$ en la fibrogénesis hepática que se produce en la hepatitis crónica por VHC queda demostrada por la relación directa entre el grado de expresión de esta citocina en tejido hepático y el estadio de fibrosis.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbate I, Lo Iacono O, Di Stefano R, Cappiello G, Girardi E, Longo R y cols. HVR-1 quasispecies modifications occur early and are correlated to initial but not sustained response in HCV-infected patients treated with pegylated- or standard-interferon and ribavirin. *J Hepatol* 2004;40:831-836.
- Accapezzato D, Francavilla V, Paroli M, Casciaro M, Chircu LV, Cividini A y cols. Hepatic expansion of a virus-specific regulatory CD8(+) T cell population in chronic hepatitis C virus infection. *J Clin Invest* 2004;113:963-972.
- Aderem A, Underhill DM. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol* 1999;17:593-623.
- Aggarwal BB, Shishodia S, Ashikawa K, Bharti AC. The role of TNF and its family members in inflammation and cancer: lessons from gene deletion. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2002;1:327-41.
- Aghemo A, Rumi MG, Soffredini R, D'Ambrosio R, Ronchi G, Del Ninno E y cols. Impaired response to interferon-alpha2b plus ribavirin in cirrhotic patients with genotype 3 hepatitis C virus infection. *Antivir Ther* 2006;11:797-802.
- Agnello V, Abel G, Elfahal M, Knigh GB, Zhang QX. Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:12766-12771.
- Agnello V, De Rosa FG. Extrahepatic disease manifestations of HCV infection: some current issues. *J Hepatol* 2004;40:341-352.
- Albert ML, Sauter B, Bhardwaj N. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature* 1998;392:86-89.
- Alberti A, Benvegnù L. Management of hepatitis C. *J Hepatol* 2003; 38 (Suppl 1): S104-S118.

- Alter HJ, Seeff LB. Recovery, persistence, and sequelae in hepatitis C virus infection: a perspective on long-term outcome. *Semin Liver Dis* 2000;20:17-35.
- Alter MJ. Prevention of spread of hepatitis C. *Hepatology* 2002;36 (Suppl 1):S93-S98.
- Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol* 2007;13:2436-2441.
- Alter MJ. Healthcare should not be a vehicle for transmission of hepatitis C virus. *J Hepatol* 2008;48: 2-4.
- Anitua E, Sanchez M, Nurden AT, Zalduendo M, de la Fuente M, Azofra J, Andia I. Reciprocal actions of platelet-secreted TGF-beta1 on the production of VEGF and HGF by human tendon cells. *Plast Reconstr Surg*. 2007;119:950-959.
- Arima N, Kao CY, Licht T, Padmanabhan R, Sasaguri Y, Padmanabhan R. Modulation of cell growth by the hepatitis C virus nonstructural protein NS5A. *J Biol Chem* 2001;276:12675-12684.
- Arrieta JJ, Rodríguez-Iñigo E, Ortiz-Movilla N, Bartolomé J, Pardo M, Manzarbeitia F y cols. In situ detection of hepatitis C virus RNA in salivary glands. *Am J Pathol* 2001;158:259-264.
- Barbeau JM, Goforth J, Caliendo AM, Nolte FS. Performance characteristics of a quantitative TaqMan hepatitis C virus RNA analyte-specific reagent. *J Clin Microbiol* 2004;42:3739-3746.
- Barril G, Traver JA. Decrease in hepatitis C virus (HCV) prevalence in hemodialysis patients in Spain: effect of time, initiating HCV prevalence studies and adoption of isolation measures. *Antiviral Res* 2003;60:129-134.

- Bartenschlager R. The NS3/4A proteinase of the hepatitis C virus: unravelling structure and function of an unusual enzyme and a prime target for antiviral therapy. *J Viral Hepat* 1999;6:165-181.
- Bassett SE, Thomas DL, Brasky KM, Lanford RE. Viral persistence, antibody to E1 and E2, and hypervariable region 1 sequence stability in hepatitis C virus-inoculated chimpanzees. *J Virol* 1999;73:1118-1126.
- Bedossa P, Poynard T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology* 1996;24:289-293.
- Benhamou Y, Bochet M, DiMartino V, Charlotte F, Azria F, Coutellier A y cols. Liver fibrosis progression in human immunodeficiency virus and hepatitis C virus coinfecting patients. The Multivirc Group. *Hepatology* 1999;30:1054-1058.
- Berenguer M, Ferrell L, Watson J, Prieto M, Kim M, Rayón M y cols. HCV-related fibrosis progression following liver transplantation: increase in recent years. *J Hepatol* 2000;32:673-684.
- Berg T, Von Wagner M, Nasser S, Sarrazin C, Heintges T, Gerlach T y cols. Extended treatment duration for hepatitis C virus type 1: comparing 48 versus 72 weeks of peginterferon-alfa-2a plus ribavirina. *Gastroenterology* 2006;130:1086-1097.
- Bertolotti A, D'Elia MM, Boni C, De Carli M, Zignego AL, Durazzo M y cols. Different cytokine profiles of intrahepatic T cells in chronic hepatitis B and hepatitis C virus infections. *Gastroenterology* 1997;112:193-199.
- Bertolotti A, Ferrari C. Kinetics of the immune response during HBV and HCV infection. *Hepatology* 2003;38:4-13.

- Beyaert R, Van Loo G, Heyninck K, Vandenabeele P. Signaling to gene activation and cell death by tumor necrosis factor receptors and Fas. *Int Rev Cytol* 2002;214:225-272.
- Bissell DM, Roulot D, George J. Transforming growth factor beta and the liver. *Hepatology* 2001;34:859-867.
- Blobel GC, Schiemann WP, Lodish HF. Role of transforming growth factor beta in human disease. *N Engl J Med* 2000;342:1350-1358.
- Boehm U, Klamp T, Groot N, Howard JC. Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol* 1997;15:749-795.
- Boyer N, Marcellin P. Pathogenesis, diagnosis and management of hepatitis C. *J Hepatol* 2000;32 (Suppl. 1):98-112.
- Bressler BL, Guindi M, Tomlinson G, Heathcote J. High body mass index is an independent risk factor for nonresponse to antiviral treatment in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2003;38:639-644.
- Bukh J, Miller RH, Purcell RH. Genetic heterogeneity of hepatitis C virus: quasispecies and genotypes. *Semin Liver Dis* 1995;15:41-63.
- Bureau C, Bernad J, Chaouche N, Orfila C, Béraud M, Gonindard C y cols. Nonstructural 3 protein of hepatitis C virus triggers an oxidative burst in human monocytes via activation of NADPH oxidase. *J Biol Chem* 2001;276:23077-23083.
- Carbone FR, Kurts C, Bennet SR, Miller JF, Heath WR. Cross-presentation: a general mechanism for CTL immunity and tolerance. *Immunol Today* 1998;19:368-373.

- Carrick RJ, Schlauder GG, Peterson DA, Mushahwar IK. Examination of the buoyant density of hepatitis C virus by polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 1992;39:279-289.
- Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975;72:3666-70.
- Caussin-Schwemling C, Schmitt C, Stoll-Keller F. Study of the infection of human blood derived monocyte/macrophages with hepatitis C virus in vitro. *J Med Virol* 2001;65:14-22.
- Caux C, Massacrier C, Vanbervliet B, Dubois B, Van Kooten C, Durand I, Banchereau J. Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. *J Exp Med* 1994;180:1263-1272.
- Cella M, Engering A, Pinet V, Pieters J, Lanzavecchia A. Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. *Nature* 1997;388:782-787.
- Cerny A, Chisari FV. Pathogenesis of chronic hepatitis C: immunological features of hepatic injury and viral persistence. *Hepatology* 1999;30:295-601.
- Chang KM, Thimme R, Melpolder JJ, Oldach D, Pemberton J, Moorhead-Loudis J y cols. Differential CD4(+) and CD8(+) T-cell responsiveness in hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2001;33:267-276.
- Chang KM. Immunopathogenesis of hepatitis C virus infection. *Clin Liver Dis* 2003;7:89-105.
- Chen RH, Chang TY. Involvement of caspase family proteases in transforming growth factor-beta-induced apoptosis. *Cell Growth Diff* 1997;8:821-827.

- Choi P, Reiser H. IL-4: role in disease and regulation of production. Clin Exp Immunol 1998;113:317-319.
- Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. Science 1989; 244:359-362.
- Conte D, Fraquelli M, Prati D, Colucci A, Minola E. Prevalence and clinical course of chronic hepatitis C virus (HCV) infection and rate of HCV vertical transmission in a cohort of 15.250 pregnant women. Hepatology 2000;31:751-755.
- Crespo J, Rivero M, Fábrega E, Cayón A, Amado JA, García-Unzeta MT, Pons-Romero F. Plasma leptin and TNF-alpha levels in chronic hepatitis C patients and their relationship to hepatic fibrosis. Dig Dis Sci 2002;47:1604-1610.
- Darwish NM, Abbas MO, Abdelfattah FM, Darwish MA. Hepatitis C virus infection in blood donors in Egypt. J Egypt Public Health Assoc 1992;67:223-236.
- Davis GL. Hepatitis C virus genotypes and quasispecies. Am J Med 1999;107 (6B):21S-26S.
- Day CL, Walker BD. Progress in defining CD4 helper cell responses in chronic viral infections. J Exp Med 2003;198:1773-1777.
- De Mitri MS, Morsica G, Cassini R, Bagaglio S, Zoli M, Alberti A, Bernardi M. Prevalence of wild-type in NS5A-PKR protein kinase binding domain in HCV-related hepatocellular carcinoma. J Hepatol 2002;36:116-122.
- Diago M, Zapater R, Tuset C, Carbonell P, Gonzalez C, Cors R, Casas E. Intrafamily transmission of hepatitis C virus: sexual and non-sexual contacts. J Hepatol 1996;25:125-128.

- Diehl AM, Rai R. Review: regulation of liver regeneration by pro-inflammatory cytokines. *J Gastroenterol Hepatol* 1996;11:466-70.
- Dienstag JL. The role of liver biopsy in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2002;36(5 Suppl 1):S152-S160.
- Dinarello CA. Interleukin-1, interleukin-1 receptors and interleukin-1 receptor antagonist. *Int Rev Immunol* 1998;16:457-499.
- Dong C, Flavell RA. Th1 and Th2 cells. *Curr Opin Hematol* 2001;8:47-51.
- Dumoulin FL, Wennrich U, Nischalke HD, Leifeld L, Fischer HP, Sauerbrunn T, Spengler U. Intrahepatic mRNA levels of interferon gamma and tumor necrosis factor alpha and response to antiviral treatment of chronic hepatitis C. *J Human Virol* 2001;4:195-199.
- Dusheiko G, Schmilovitz-Weiss H, Brown D, McOmish F, Yap PL, Sherlock S y cols. Hepatitis C virus genotypes: an investigation of type-specific differences in geographic origin and disease. *Hepatology* 1994;19:13-18.
- Enomoto N, Sakuma I, Asahina Y, Korusaki M, Murakami T, Yamamoto C y cols. Comparison of full-length sequences of interferon-sensitive and resistant hepatitis C virus 1b. Sensitivity to interferon is conferred by amino acid substitutions in the NS5A region. *J Clin Invest* 1995;96:224-230.
- Erhardt A, Hassan M, Heintges T, Haüssinger D. Hepatitis C virus core protein induces cell proliferation and activates ERK, JNK, and p38 MAP kinases together with the MAP kinase phosphatase MKP-1 in a HepG2 Tet-Off cell line. *Virology* 2002;292:272-284.
- Esteban JI, Esteban R, Viladomiu L, López-Talavera JC, González A, Hernández JM y cols. Hepatitis C virus antibodies among risk groups in Spain. *Lancet* 1989;2:294-297.

- Esteban JI, González A, Hernández JM, Viladomiu L, Sánchez C, López-Talavera JC y cols. Evaluation of antibodies to hepatitis C virus in a study of transfusion-associated hepatitis. *N Engl J Med* 1990;323:1107-1112.
- Farci P, Alter HJ, Shimoda A, Govindarajan S, Cheung LC, Melpolder JC y cols. Hepatitis C virus-associated fulminant hepatic failure. *N Engl J Med* 1996;335:631-634.
- Farci P, Purcell RH. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes and quasiespecies. *Semin Liver Dis* 2000;20:103-126.
- Farci P, Shimoda A, Coiana A, Diaz G, Peddis G, Melpolder JC y cols. The outcome of acute hepatitis C predicted by the evolution of the viral quasiespecies. *Science* 2000; 288:339-344.
- Farci P, Shimoda A, Wong D, Cabezon T, De Gioannis D, Strazzera A y cols. Prevention of hepatitis C virus infection in chimpanzees by hyperimmune serum against the hypervariable region 1 of the envelope 2 protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:15394-15399.
- Farreras P y Rozman C. *Medicina Interna* 14ª Ed., vol. II, págs 3062-3076. Harcourt Ediciones.
- Ferrari C, Urbani S, Penna A, Cavalli A, Valli A, Lamonaca V y cols. Immunopathogenesis of hepatitis C infection. *J Hepatol* 1999;31(Suppl 1):31-38.
- Forns X, Fernández-Llama P, Pons M, Costa J, Ampurdanés S, López-Labrador FX cols. Incidence and risk factors of hepatitis C virus infection in a haemodialysis unit. *Nephrol Dial Transplant* 1997;12:736-740.
- Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, Smith C, Marinos G, Gonçalves FL Jr y cols. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2002;347:975-982.

- Friedman SL. The cellular basis of hepatic fibrosis, mechanisms and treatment strategies. *N Engl J Med* 1993;328:1828-1835.
- Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem* 2000;275:2247-2250.
- Fukuda R, Ishimura N, Ishisaka S, Chowdhury A, Moriyama N, Nogami C y cols. Intrahepatic expression of pro-inflammatory cytokine mRNAs and interferon efficacy in chronic hepatitis C. *Liver* 1996;16:390-399.
- García Buey L, García Monzón C. Manifestaciones extrahepáticas de la hepatitis C. *GH continuada* 2001;1:64-69.
- Garg A, Aggarwal BB. Nuclear transcription factor-kappaB as a target for cancer drug development. *Leukemia* 2002;16:1053-68.
- Gately MK, Renzetti LM, Magram J, Stern AS, Adorini L, Gubler U, Presky DH. The interleukin-12/interleukin-12 receptor system: role in normal and pathologic immune responses. *Annu Rev Immunol* 1998;16:495-521.
- Gebo KA, Herlong HF, Torbenson MS, Jenckes MW, Chander G, Ghanem KG y cols. Role of liver biopsy in management of chronic hepatitis C: a systematic review. *Hepatology* 2002;36(Suppl 1):S161-S172.
- Gerlach JT, Diepolder HM, Zachoval R, Gruener NH, Jung MC, Ulsenheimer A y cols. Acute hepatitis C: high rate of both spontaneous and treatment-induced viral clearance. *Gastroenterology* 2003;125:80-88.
- Germain RN, Margulies DH. The biochemistry and cell biology of antigen processing and presentation. *Annu Rev Immunol* 1993;11:403-450.
- Gibb DM, Goodall RL, Dunn DT, Healy M, Neave P, Cafferkey M, Butter K. Mother-to-child transmission of hepatitis C virus: evidence for preventable peripartum transmission. *Lancet* 2000;356:904-907.

- González-Amaro R, García-Monzon C, García-Buey L, Moreno-Otero R, Alonso JL, Yagüe E y cols. Induction of tumor necrosis factor alpha production by human hepatocytes in chronic viral hepatitis. *J Exp Med* 1994;179:841-8.
- Gonzalez-Peralta RP, Davis GL, Lau JY. Pathogenetic mechanisms of hepatocellular damage in chronic hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 1994;21:255-259.
- Goodman ZD, Ishak KG. Histopathology of hepatitis C virus infection. *Semin Liver Dis* 1995;15:70-81.
- Gordon SC, Elloway RS, Long JC, Dmuchowski CF. The pathology of hepatitis C as a function of mode of transmission: blood transfusion vs intravenous drug use. *Hepatology* 1993;18:1338-1343.
- Grakoui A, McCourt DW, Wychowski C, Feinstone SM, Rice CM. Characterization of the hepatitis C virus-encoded serine proteinase: determination of proteinase-dependent polyprotein cleavage sites. *J Virol* 1993;67:2832-2843.
- Gressner AM. Cytokines and cellular crosstalk involved in the activation of fat-storing cells. *J Hepatol* 1995;22:28-36.
- Guermonprez P, Valladeau J, Zitvogel L, Théry C, Amigorena S. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2002;20:621-667.
- Guicciardi ME, Deussing J, Miyoshi H, Bronk SF, Svingen PA, Peters C y cols. Cathepsin B contributes to TNF-alpha-mediated hepatocyte apoptosis by promoting mitochondrial release of cytochrome c. *J Clin Invest* 2000;106:1127-1137.
- Habersetzer F, Fournillier A, Dubuisson J, Rosa D, Abrignani S, Wychowski C y cols. Characterization of human monoclonal antibodies specific to the hepatitis

- C virus glycoprotein E2 with in vitro binding neutralization properties. *Virology* 1998;249:32-41.
- Hadziyannis SJ, Sette HJr, Morgan TR, Balan V, Diago M, Marcellin P y cols. Peginterferon-alpha 2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C: a randomized study of treatment duration and ribavirin dose. *Ann Inter Med* 2004;140:346-355.
 - Hernandez ME, Bruguera M, Puyuelo T, Barrera JM, Sanchez Tapias JM, Rodés J. Risk of needle-stick injuries in the transmission of hepatitis C virus in hospital personnel. *J Hepatol* 1992;16:56-58.
 - Heydtmann M, Shields P, McCaughan G, Adams D. Cytokines and chemokines in the immune response to hepatitis C infection. *Curr Opin Infect Dis* 2001;14:279-287.
 - Heyninck K, Wullaert A, Beyaert R. Nuclear factor-kappa B plays a central role in tumor necrosis factor-mediated liver disease. *Biochemical Pharmacology* 2003;66:409-415.
 - Hiasa Y, Kamegaya Y, Nuriya H, Onji M, Kohara M, Schmidt EV, Chung RT. Protein kinase R is increased and is functional in hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. *Am J Gastroenterol* 2003; 98:2528-2534.
 - Hino K, Sainokami S, Shimoda K, Niwa H, Iino S. Clinical course of acute hepatitis C and changes in HCV markers. *Dig Dis Sci* 1994;39:19-27.
 - Hoffmann KF, Cheever AW, Wynn TA. IL-10 and the dangers of immune polarization: excessive type 1 and type 2 cytokine responses induce distinct forms of lethal immunopathology in murine schistosomiasis. *J Immunol* 2000;164:6406-6416.
 - Honda M, Beard MR, Ping LH, Lemon SM. A phylogenetically conserved stem-loop structure at the 5' border of the internal ribosome entry site of hepatitis C

- virus is required for cap-independent viral translation. *J Virol* 1999;73:1165-1174.
- Hoofnagle JH. Course and outcome of hepatitis C. *Hepatology* 2002;36:S21-S29.
 - Hultgren C, Milich DR, Weiland O, Sällberg M. The antiviral compound ribavirin modulates the T helper (Th)1/Th2 subset balance in hepatitis B and C virus-specific immune responses. *J Gen Virol* 1998;79:2381-2391.
 - Ishak K, Baptista A, Bianchi L, Callea F, De Groote J, Gudat F y cols. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol* 1995;22:696-699.
 - Itoh Y, Okanoue T, Ohnishi N, Sakamoto M, Nishioji K, Nakagawa Y y cols. Serum levels of soluble tumor necrosis factor receptors and effects of interferon therapy in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Am J Gastroenterol* 1999;94:1332-1340.
 - Jacobson-Brown PM, Neuman MG. Immunopathogenesis of hepatitis C viral infection: Th1/Th2 responses and the role of cytokines. *Clin Biochem* 2001;34:167-171.
 - Janczewska-Kazek E, Marek B, Kajdaniuk D, Borgiel-Marek H. Effect of interferon alpha and ribavirin treatment on serum levels of transforming growth factor- β 1, vascular endothelial growth factor, and basic fibroblast growth factor in patients with chronic hepatitis C. *World J gastroenterol* 2006;12:961-965.
 - Kakumu S, Okumura A, Ishikawa T, Yano M, Enomoto A, Nishimura H y cols. Serum levels of IL-10, IL-15 and soluble tumor necrosis factor- α (TNF- α) receptors in type C chronic liver disease. *Clin Exp Immunol* 1997;109:458-463.

- Kallinowski B, Haseroth K, Marinos G, Hanck C, Stremmel W, Theilmann L y cols. Induction of tumour necrosis factor (TNF) receptor type p55 and p75 in patients with chronic hepatitis C virus (HCV) infection. *Clin Exp Immunol* 1998;111:269-277.
- Kamal SM, Rasenack JW, Bianchi L, Al Tawil A, El Sayed Khalifa K, Peter T y cols. Acute hepatitis C without and with schistosomiasis: correlation with hepatitis C-specific CD4(+) T-cell and cytokine response. *Gastroenterology* 2001;121:646-656.
- Kanzler S, Baumann M, Schirmacher P, Dries V, Bayer E, Gerken G y cols. Prediction of progressive liver fibrosis in hepatitis C infection by serum and tissue levels of transforming growth factor-beta. *J Viral Hepat* 2001;8:430-437.
- Kato N. Molecular virology of hepatitis C virus. *Acta Med Okayama* 2001;55:133-159.
- Kim JL, Morgenstern KA, Griffith JP, Dwyer JP, Thomson JA, Murcko MA y cols. Hepatitis C virus NS3 ARN helicase domain with a bound oligonucleotide: The crystal structure provides insights into the odes of unwinding. *Structure* 1998;6:89-100.
- Kim WR. The burden of hepatitis C in the United States. *Hepatology* 2002; 36(Suppl1):S30-S34.
- Kinnman N, Andersson U, Hultcrantz R. In situ expression of transforming growth factor-beta1-3, latent transforming growth factor-beta binding protein and tumor necrosis factor-alpha in liver tissue from patients with chronic hepatitis C. *Scand J Gastroenterol* 2000;35:1294-1300.
- Kittlesen DJ, Chianese-Bullock KA, Yao ZQ, Braciale TJ, Hahn YS. Interaction between complement receptor gC1qR and hepatitis C virus core protein inhibits T-lymphocyte proliferation. *J Clin Invest* 2000;106:1239-1249.

- Kiyosawa K, Tanaka E, Sodeyama T, Yoshizawa K, Yabu K, Furuta K y cols. Transmission of hepatitis C in an isolated area in Japan: community-acquired infection. The South Kiso Hepatitis Study Group. *Gastroenterology* 1994;106:1596-1602.
- Kmiecik D, Biernacka-Lukanty J, Migdalski P, Turek-Plewa J, Wierzbicki A, Juszczyk J, Trzeciak WH. A correlation between the heterogeneity of hypervariable region 1 of E2 glycoprotein of Hepatitis C virus (HCV) and HCV antibody profile: a case study. *Acta Virol* 2005;49:97-103.
- Knodell RG, Ishak KG, Black WC, Chen TS, Craig R, Kaplowitz N y cols. Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. *Hepatology* 1981;1:431-435.
- Kolykhalov AA, Feinstone SM, Rice CM. Identification of a highly conserved sequence element at the 3' terminus of hepatitis C virus genome RNA. *J Virol* 1996;70:3363-3371.
- Kolykhalov AA, Mihalik K, Feinstone SM, Rice CM. Hepatitis C virus-encoded enzymatic activities and conserved RNA elements in the 3' non-translated region are essential for virus replication in vivo. *J Virol* 2000;74:2046-2051.
- Koziel MJ. Cytokines in viral hepatitis. *Semin Liver Dis* 1999;19:157-169.
- Krummel MF, Allison JP. CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *J Exp Med* 1995;182:459-465.
- Kuo G, Choo QL, Alter HJ, Gitnick GL, Redeker AG, Purcell RH y cols. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science* 1989;244:362-364.
- Ladero JM, López-Alonso G, Devesa MJ, Cuenca F, Agreda M, Ortega L y cols. "12 weeks' stopping rule" in the treatment of genotype 1 chronic hepatitis C:

Two prognostic categories under the same label?. Scand J Gastroenterol 2008; 43: (pendiente de publicación. *E-pub ahead of print, april 1: 1-5*).

- Lai MM. Hepatitis C virus proteins: direct link to hepatic oxidative stress, steatosis, carcinogenesis and more. Gastroenterology 2002;122:568-571.
- Lauer GM, Walker BD. Hepatitis C virus infection. N Engl J Med 2001;345:41-52.
- Lee JH, Roth WK, Zeuzem S. Evaluation and comparison of different hepatitis C virus genotyping and serotyping assays. J Hepat 1997;26:1001-1009.
- Lee SS, Heathcote EJ, Reddy KR, Zeuzem S, Fried MW, Wright TL y cols. Prognostic factors and early predictability of sustained viral response with peginterferon alpha-2a (40kD). J Hepatol 2002;37:500-506.
- Leist M, Gantner F, Bohlinger I, Tiegs G, Germann PG, Wendel A. Tumor necrosis factor-induced hepatocyte apoptosis precedes liver failure in experimental murine shock models. Am J Pathol 1995;146:1220-34.
- Li X, Jeffers LJ, Shao L, Reddy KR, Cheinquer H, Coelho-Little E y cols. Identification of hepatitis C virus by immunoelectron microscopy. J Viral Hepat 1995;2:227-234.
- Liang TJ, Rehermann B, Seeff LB, Hoofnagle JH. Pathogenesis, natural history, treatment, and prevention of hepatitis C. Ann Intern Med 2000;132:296-305.
- Liaw YF, Lee CS, Tsai SL, Liaw BW, Chen TC, Sheen IS, Chu CM. T-cell-mediated autologous hepatocytotoxicity in patients with chronic hepatitis C virus infection. Hepatology 1995;22:1368-1373.
- Liberman E, Fong YL, Selby MJ, Choo QL, Cousens L, Houghton M, Yen TS. Activation of the grp78 and grp94 promoters by hepatitis C virus E2 envelope protein. J Virol 1999;73:3718-3722.

- Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 2001;104:487-501.
- Luster AD. Chemokines-chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med* 1998;338:436-445.
- Maecker HT, Todd SC, Levy S. The tetraspanin superfamily: molecular facilitators. *FASEB J* 1997;11:428-442.
- Major M, Feinstone SM. The molecular virology of hepatitis C. *Hepatology* 1997;25:1527-1538.
- Major ME, Mihalik K, Fernandez J, Seidman J, Kleiner D, Kolykhalov AA y cols. Long-term follow-up of chimpanzees inoculated with the first infectious clone for hepatitis C virus. *J Virol* 1999;73:3317-3325.
- Manns MP, McHutchison JG, Gordon SC, Rustgi VK, Shiffman M, Reindollar R y cols. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet* 2001;358:958-965.
- Marcellin P. Hepatitis C: clinical spectrum of the disease. *J Hepatol* 1999;31(Suppl1):9-16.
- Martin TG, Somberg KA, Meng YG, Cohen RL, Heid CA, de Sauvage FJ, Shuman MA. Thrombopoietin levels in patients with cirrhosis before and after orthotopic liver transplantation. *Ann Intern Med* 1997;127: 285-288.
- Martínez-Bauer E, Forns X, Armelles M, Planas R, Solà R, Vergara M y cols. Hospital admission is a relevant source of hepatitis C virus acquisition in Spain. *J Hepatol* 2008;48:20-27.

- Marusawa H, Hijikata M, Chiba T, Shimotohno K. Hepatitis C virus core protein inhibits Fas- and tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis via NF-kappa B activation. *J Virol* 1999;73:4713-4720.
- Matsumoto M, Hsieh TY, Zhu N, VanArsdale T, Hwang SB, Jeng KS y cols. Hepatitis C virus core protein interacts with the cytoplasmic tail of lymphotoxin-beta receptor. *J Virol* 1997;71:1301-1309.
- Matsuzaki K, Murat M, Yoshida K, Sekimoto G, Uemura Y, Sakaida N, Kaibori M y cols. Chronic inflammation associated with hepatitis C virus infection perturbs hepatic transforming growth factor beta signaling, promoting cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2007;46:48-57.
- McCormick SE, Goodman ZD, Maydonovitch CL, Sjogren MH. Evaluation of liver histology, ALT elevation, and HCV RNA titer in patients with chronic hepatitis C. *Am J Gastroenterol* 1996;91:1516-1522.
- McHutchison JG, Gordon SC, Schiff ER,, Rustgi VK y cols. Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. The International Hepatitis Interventional Therapy Group. *N Engl J Med* 1998;339:1485-1492.
- McHutchison JG, Poynard T, Pianko S, Gordon SC, Reid AE, Dienstag J y cols. The impact of interferon plus ribavirin on response to therapy in black patients with chronic hepatitis C. The International Hepatitis Interventional Therapy Group. *Gastroenterology* 2000;119:1317-1323.
- McHutchison JG, Manns M, Patel K, Poynard T, Lindsay KL, Trepo C y cols. Adherence to combination therapy enhances sustained response in genotype-1-infected patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2002;123:1061-1069.

- McLauchlan J. Properties of the hepatitis C virus core protein: a structural protein that modulates cellular processes. *J Viral Hepat* 2000;7:2-14.
- Meager A. Cytokine regulation of cellular adhesion molecule expression in inflammation. *Cytokine Growth Factor Rev* 1999;10:27-39.
- Mellor J, Holmes EC, Jarvis LM, Yap PL, Simmonds P. Investigation of the pattern of hepatitis C virus sequence diversity in different geographical regions: implications for virus classification. The International HCV Collaborative Study Group. *J Gen Virol* 1995;76:2493-2507.
- Memon MI, Memon MA. Hepatitis C: an epidemiological review. *J Hepatol* 2002; 9:84-100.
- Minola E, Maccabruni A, Pacati I, Martinetti M. Amniocentesis as a possible risk factor for mother-to-infant transmission of hepatitis C virus. *Hepatology* 2001;33:1341-1342.
- Missale G, Bertoni R, Lamonaca V, Valli A, Massari M, Mori C y cols. Different clinical behaviors of acute hepatitis C virus infection are associated with different vigor of the anti-viral cell-mediated immune response. *J Clin Invest* 1996;98:706-714.
- Monto A, Alonzo J, Watson JJ, Grunfeld C, Wright TL. Steatosis in chronic hepatitis C: relative contribution of obesity, diabetes mellitus, and alcohol. *Hepatology* 2002;36:729-736.
- Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 2001;19:683-765.
- Morel PA, Oriss TB. Crossregulation between Th1 and Th2 cells. *Crit Rev Immunol* 1998;18:275-303.

- Morishima C, Gretch DR. Clinical use of hepatitis C virus test for diagnosis and monitoring during therapy. *Clin Liver Dis* 1999;3:717-740.
- Muto Y, Nouri-Aria KT, Meager A, Alexander GJ, Eddleston AL, Williams R. Enhanced tumor necrosis factor and interleukin-1 in fulminant hepatic failure. *Lancet* 1988;2:72-74.
- Napoli J, Bishop GA, McGuinness GH, Painter DM, McCaughan GW. Progressive liver injury in chronic hepatitis C infection correlates with increased intrahepatic expression of Th1-associated cytokines. *Hepatology* 1996;24:759-765.
- Nelson DR, Gonzalez-Peralta RP, Qian K, Xu Y, Marousis cG, Davis GL, Lau JY. Transforming growth factor-beta 1 in chronic hepatitis C. *J Viral Hepat* 1997;4:29-35.
- Nelson DR, Marousis CG, Ohno T, Davis GL, Lau JY. Intrahepatic hepatitis C virus-specific cytotoxic T lymphocyte activity and response to interferon alfa therapy in chronic hepatitis C. *Hepatology* 1998;28:225-230.
- Neuman M, Angulo P, Malkiewicz I, Jorgensen R, Shear N, Dickson ER y cols. Tumor necrosis factor-alpha and transforming growth factor-beta reflect severity of liver damage in primary biliary cirrhosis. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17:196-202.
- Neuman MG. Cytokines and inflamed liver. *Clin Invest Med* 1998;23:1-6.
- Neuman MG, Benhamou JP, Martinot M, Boyer N, Shear NH, Malkiewicz I y cols. Predictors of sustained response to alpha interferon therapy in chronic hepatitis C. *Clin Biochem* 1999;32:537-542.
- Neuman MG, Benhamou JP, Malkiewicz IM, Akremi R, Shear NH, Asselah T y cols. Cytokines as predictors for sustained response and as markers for

- immunomodulation in patients with chronic hepatitis C. Clin Biochem 2001a;34:173-182.
- Neuman MG, Blendis LM, Shear NH, Malkiewicz IM, Ibrahim A, Katz GG y cols. Cytokine network in nonresponding chronic hepatitis C patients with genotype 1: role of triple therapy with interferon alpha, ribavirin, and ursodeoxycholate. Clin Biochem 2001b;34:183-188.
 - Neuman MG, Benhamou JP, Bourliere M, Ibrahim A, Malkiewicz I, Asselah T y cols. Serum tumor necrosis factor-alpha and transforming growth factor-beta levels in chronic hepatitis C patients are immunomodulated by therapy. Cytokine 2002a;17:108-117.
 - Neuman MG, Benhamou JP, Ibrahim A, Malkiewicz I, Spircu T, Martinot-Peignoux M y cols. Role of cytokines in the assessment of the severity of chronic hepatitis C and the prediction of response to therapy. Rom J Gastroenterol 2002b;11:97-103.
 - Neuman MG, Benhamou JP, Malkiewicz IM, Ibrahim A, Valla DC, Martinot-Peignoux M y cols. Kinetics of serum cytokines reflect changes in the severity of chronic hepatitis C presenting minimal fibrosis. J Viral Hepat 2002c;9:134-140.
 - Neuman MG, Benhamou JP, Marcellin P, Valla D, Malkiewicz IM, Katz GG y cols. Cytokine-chemokine and apoptotic signatures in patients with hepatitis C. Translational Research 2007;149:126-136.
 - Neumann AU, Lam NP, Dahari H, Gretch DR, Wiley TE, Layden TJ, Perelson AS. Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon-alpha therapy. Science 1998;282:103-107.
 - Nishise Y, Saito T, Sugahara K, Ito II, Saito K, Togashi H y cols. Risk of hepatocellular carcinoma and secondary structure of hepatitis C virus (HVC)

- NS3 protein amino-terminus, in patients infected with HCV subtype 1b. *J Infect Dis* 2007;196:1006-1009.
- O'Garra A. Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. *Immunity* 1998;8:275-283.
 - Okamoto H, Kojima M, Okada S, Yoshizawa H, Iizuka H, Tanaka T y cols. Genetic drift of hepatitis C virus during 8.2-year infection in a chimpanzee: variability and stability. *Virology* 1992;190:894-899.
 - Okamoto M, Nagata I, Murakami J, Kaki S, Iitsuka T, Hoshika T y cols. Prospective reevaluation of risk factors in mother-to-child transmission of hepatitis C virus: high virus load, vaginal delivery, and negative anti-NS4 antibody. *J Infect Dis* 2000;182:1511-1514.
 - Okuda M, Li K, Beard MR, Showalter LA, Scholle F, Lemon SM, Weinmann SA. Mitochondrial injury, oxidative stress, and antioxidant gene expression are induced by hepatitis C virus core protein. *Gastroenterology* 2002;122:366-375.
 - Old LJ. Tumor necrosis factor (TNF). *Science* 1985;230:630-632.
 - Papadakis KA, Targan SR. Tumor necrosis factor: biology and therapeutic inhibitors. *Gastroenterology* 2000;119:1148-1157.
 - Patarroyo M, Makgoba MW. Leucocyte adhesion to cells in immune and inflammatory responses. *Lancet* 1989;2:1139-1142.
 - Pawlotsky JM. Diagnostic test for hepatitis C. *J Hepatol* 1999;31(Supl 1):71-79.
 - Pawlotsky JM. Use and interpretation of virological tests for hepatitis C. *Hepatology* 2002;36(Supl 1):S65-S73.
 - Pawlotsky JM, Dahari H, Neumann AU, Hezode C, Germanidis G, Lonjon I y cols. Antiviral action of ribavirin in chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2004;126:703-714.

- Pearlman BL, Ehleben C, Saifee S. Treatment extension to 72 weeks of peginterferon and ribavirin in hepatitis C genotype 1-infected slow responders. *Hepatology* 2007 46:1688-94.
- Perez-Trallero E, Cilla G, Saenz JR. Occupational transmission of HCV. *Lancet* 1994;344:548.
- Perlemuter G, Sabile A, Letteron P, Vona G, Topilco A, Chrétien Y y cols. Hepatitis C virus core protein inhibits microsomal triglyceride transfer protein activity and very low density lipoprotein secretion: a model of viral-related steatosis. *FASEB J* 2002;16:185-194.
- Perz JF, Farrington LA, Pecoraro C, Hutin YJF, Armstrong GL. Estimated global prevalence of hepatitis C virus infection. 42nd Annual Meeting of the Infectious Diseases Society of America; Boston, MA; sept 30-Oct 3,2004.
- Pessione F, Ramond MJ, Njapoum C. Cigarette smoking and hepatic lesions in patients with chronic hepatitis. *Hepatology* 2001;34:121-125.
- Peters M. Actions of cytokines on the immune response and viral interactions: an overview. *Hepatology* 1996;23:909-916.
- Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S, Galli G, Falugi F, Petracca R y cols. Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* 1998;282:938-941.
- Poordad FF, Khatibi B, Tran TT. Analysis of HCV therapies and algorithms: where we are now and the near future. *Hepatology Rev* 2007;4:3-8.
- Poynard T, Marcellin P, Lee SS, Niederau C, Minuk GS, Ideo G y cols. Randomised trial of interferon alpha2b plus ribavirin for 48 weeks or for 24 weeks versus interferon alpha2b plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C virus. International Hepatitis Interventional Therapy Group (IHIT). *Lancet* 1998;352:1426-1432.

- Poynard T, McHutchison J, Goodman Z, Ling MH, Albrecht J. Is an “a la carte” combination interferon alfa-2b plus ribavirin regimen possible for the first line treatment in patients with chronic hepatitis C?. The ALGOVIRC Project Group. *Hepatology* 2000;31:211-218.
- Poynard T, Ratziu V, Charlotte F, Goodman Z, McHutchison J, Albrecht J. Rates and risk factors of liver progression in patients with chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2001;34:730-739.
- Poynard T, Yuen MF, Ratziu V, Lai CL. Viral hepatitis C. *Lancet* 2003;362:2095-2100.
- Prezzi C, Casciaro MA, Francavilla V, Schiaffella E, Finocchi L, Chircu LV y cols. Virus-specific CD8(+) T cells with type 1 or type 2 cytokine profile are related to different disease activity in chronic hepatitis C virus infection. *Eur J Immunol* 2001;31:894-906.
- Ramadori G, Christ B. Cytokines and hepatic acute-phase response. *Semin Liver Dis* 1999;19:141-155.
- Reherrmann B. Interaction between the hepatitis C virus and the immune system. *Semin Liver Dis* 2000;20:127-141.
- Rivas-Estilla AM, Svitkin Y, Lopez-Lastra M, Hatzoglou m, Sherker A, Koromillas AE. PKR-dependent mechanisms of gene expression from a subgenomic hepatitis C virus clone. *J Virol* 2002;76:10637-10653.
- Rosenberg S. Recent advances in the molecular biology of hepatitis C virus. *J Mol Biol* 2001;313:451-464.
- Ross RS, Viazov SO, Hoffmann S, Roggendorf M. Performance characteristics of a transcription-mediated nucleic acid amplification assay for qualitative detection of hepatitis C virus RNA. *J Clin Lab Anal* 2001;15:308-313.

- Rothe M, Sarma V, Dixit VM, Goeddel DV. TRAF2-mediated activation of NF-kappa B by TNF receptor 2 and CD40. *Science* 1995;269:1424-1427.
- Rumi MG, Colombo M, Gringeri A, Mannucci PM. High prevalence of antibody to hepatitis C virus in multitransfused hemophiliacs with normal transaminase levels. *Ann Intern Med* 1990;112:379-380.
- Sacristán B, Gastanares MI, Elena A, Sacristán M, Barcenilla J, García JC, Yangüela J. Seroepidemiologic study of hepatitis C virus infection in a general population from the region of La Rioja, Spain. *Med Clin* 1996;107:331-335.
- Salvadó M. Uso clínico de las pruebas de laboratorio disponibles para el diagnóstico de la hepatitis C. *Hepat hoy* 2005;1:129-137.
- Sánchez-Tapias JM, Diago M, Escartín P, Enríquez J, Romero-Gómez M, Bárcena R y cols. Peginterferon-alfa2a plus ribavirin for 48 versus 72 weeks in patients with detectable hepatitis C virus RNA at week 4 of treatment. *Gastroenterology* 2006;131:451-460.
- Sanz-Cameno P, Borque MJ, García-Buey L, Moreno-Otero R. Interaction of the hepatitis C virus with the cellular membrane. *Gastroenterol Hepatol* 2002;25:521-525.
- Sarrazin C, Hendricks DA, Sedarati F, Zeuzem S. Assessment, by transcription-mediated amplification, of virologic response in patients with chronic hepatitis C virus treated with peginterferon alpha-2a. *J Clin Microbiol* 2001;39:2850-2855.
- Scheuer PJ. Classification of chronic viral hepatitis: a need for reassessment. *J Hepatol* 1991;13:372-374.
- Schmilovitz-Weiss H, Levy M, Thompson N, Dusheiko G. Viral markers in the treatment of hepatitis B and C. *Gut* 1993;34(Suppl 1):S26-S35.

- Schreiber GB, Busch MP, Kleinman SH, Korelitz JJ. The risk of transfusion-transmitted viral infection. *N Engl J Med* 1996;334:1685-1690.
- Schuurhuis DH, Laban S, Toes RE, Ricciardi-Castagnoli P, Kleijmeer MJ, van der Voort EI y cols. Immature dendritic cells acquire CD8(+) cytotoxic T lymphocyte priming capacity upon activation by T helper cell-independent or – dependent stimuli. *J Exp Med* 2000;192:145-150.
- Seeff LB, Hoofnagle JH. National Institutes of Health Consensus Conference Statement: Management of Hepatitis C 2002. *Hepatology* 2002;36(Suppl 1):S3-S20.
- Selby MJ, Glazer E, Masiarz F, Houghton M. Complex processing and protein: protein interactions in the E2: NS2 region of HCV. *Virology* 1994;204:114-122.
- Sen GC, Ransohoff RM. Interferon-induced antiviral actions and their regulation. *Adv Virus Res* 1993;42:57-102.
- Shakil AO, Conry-Cantilena C, Alter HJ, Hayashi P, Kleiner DE, Tedeschi V y cols. Volunteer blood donors with antibody to hepatitis C virus: clinical, biochemical, virologic, and histologic features. The Hepatitis C Study Group. *Ann Intern Med* 1995;123:330-337.
- Shepard CW, Finelli L, Alter MJ. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *Lancet Infect Dis* 2005;5:558-567.
- Shiffman ML, Suter F, Bacon BR, Nelson D, Harley H, Solá R y cols. Peginterferon alfa-2a and ribavirin for 16 or 24 weeks in HCV genotype 2 or 3. *N Engl J Med* 2007;357:124-34.
- Shimizu YK, Feinstone SM, Kohara M, Purcell RH, Yoshikura H. Hepatitis C virus: detection of intracellular virus particles by electron microscopy. *Hepatology* 1996;23:205-209.

- Simmonds P. Variability of hepatitis C virus. *Hepatology* 1995;21:570-583.
- Solá R, Cruz de Castro E, Hombrados M, Planas R, Coll S, Jardí R y cols. Prevalence of hepatitis B and hepatitis C viruses in different counties of Catalonia, Spain: cross-sectorial study. *Med Clin* 2002;119:90-95.
- Sporea I, Popescu A, Sirli R, Golea O, Totolici C, Danila M y cols. Pegylated-interferon alpha 2a treatment for chronic hepatitis C in patients on chronic haemodialysis. *World J Gastroenterol* 2006;12:4191-4194.
- Strader DB, Wright T, Thomas DL, Seeff LB. Diagnosis, management and treatment of hepatitis C. *Hepatology* 2004;39:1147-1171.
- Stuyver L, Rossau R, Wyseur A, Duhamel M, Vanderborght B, Van Heuverswyn H, Maertens G. Typing of hepatitis C virus isolates and characterization of new subtypes using a line probe assay. *J Gen Virol* 1993;74:1093-1102.
- Sugimoto K, Ikeda F, Stadanlick J, Nunes FA, Alter HJ, Chang KM. Suppression of HCV-specific T cells without differential hierarchy demonstrated ex vivo in persistent HCV infection. *Hepatology* 2003;38:1437-1448.
- Sypniewski D, Jurzak M, Cholewa K, Gola J, Mazurek U, Wilczok T y cols. Changes in TNF-alpha mRNA levels in the peripheral blood of patients with chronic hepatitis C virus (HCV) infection during alpha-interferon and ribavirin therapy. *Viral Immunol* 2004;17:580-587.
- Tabone M, Sidoli L, Laudi C, Pellegrino S, Rocca G, Della Monica P y cols. Alcohol abstinence does not offset the strong negative effect of lifetime alcohol consumption on the outcome of interferon therapy. *J Viral Hepat* 2002;9:288-294.

- Takaki A, Wiese M, Maertens G, Depla E, Seifert U, Liebetrau A y cols. Cellular immune responses persist and humoral responses decrease two decades after recovery from a single-source outbreak of hepatitis C. *Nat Med* 2000;6:578-582.
- Takikawa S, Ishii K, Aizaki H, Suzuki T, Asakura H, Matsuura Y, Miyamura T. Cell fusion activity of hepatitis C virus envelope proteins. *J Virol* 2000;74:5066-5074.
- Taliani G, Badolato MC, Nigro G, Biasin M, Boddi V, Pasquazzi C, Clerici M. Serum concentration of gammaGT is a surrogate marker of hepatic TNF-alpha mRNA expression in chronic hepatitis C. *Clin Immunol* 2002;105:279-285.
- Tan SL, Katze MG. How hepatitis C virus counteracts the interferon response: the jury is still out on NS5A. *Virology* 2001;284:1-12.
- Taylor DR, Shi ST, Romano PR, Barber GN, Lai MM. Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PKR by HCV E2 protein. *Science* 1999;285:107-110.
- Tellinghuisen TL, Rice CM. Interaction between hepatitis C virus proteins and host cell factors. *Curr Opin Microbiol* 2002;5:419-427.
- Terrault NA. Sexual activity as a risk factor for hepatitis C. *Hepatology* 2002;36(Suppl1):S99-S105.
- Thaler MM, Park CK, Landers DV, Wara DW, Houghton M, Veereman-Wauters G y cols. Vertical transmission of hepatitis C virus. *Lancet* 1991;338:17-18.
- Thimme R, Oldach D, Chang KM, Steiger C, Ray SC, Chisari FV. Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection. *J Exp Med* 2001;194:1395-1406.
- Tilg H, Wilmer A, Vogel W, Herold M, Nölchen B, Judmaier G, Huber C. Serum levels of cytokines in chronic liver diseases. *Gastroenterology* 1992;103:264-74.

- Tilg H. New insights into the mechanisms of interferon alfa: an immunoregulatory and anti-inflammatory cytokine. *Gastroenterology* 1997;112:1017-1021.
- Trapero-Marugán M, Moreno-Monteagudo JA, García-Buey L, Borque MJ, Medina J, García-Sánchez A, Moreno-Otero R. Clinical and pathological characteristics and response to combination therapy of genotype 4 chronic hepatitis C patients: experience from a spanish center. *J Chemother* 2007;19:423-427.
- Trapero-Marugán M, García-Buey L, Muñoz C, Quintana NE, Moreno-Monteagudo JA, Borque MJ y cols. Sustained virological response to peginterferon plus ribavirin in chronic hepatitis C genotype 1 patients is associated with a persistent Th1 immune response. *Aliment Pharmacol Ther* 2006;24:117-128.
- Tsai SL, Liaw YF, Chen MH, Huang CY, Kuo GC. Detection of type 2-like T-helper cells in hepatitis C virus infection: implications for hepatitis C virus chronicity. *Hepatology* 1997;25:449-458.
- Tumminelli F, Marcellin P, Rizzo S, Barbera S, Corvino G, Furia P y cols. Shaving as potential source of hepatitis C virus infection. *Lancet* 1995;345:658.
- Umlauft F, Wong DT, Oefner PJ, Underhill PA, Cheung RC, Wright TL y cols. Hepatitis C virus detection by single-round PCR specific for the terminal 3' noncoding region. *J Clin Microbiol* 1996;34:2552-2558.
- Vandenabeele P, Declercq W, Beyaert R, Fiers W. Two tumor necrosis factor receptors: structure and function. *Trends Cell Biol* 1995;5:392-399.
- Vassalli P. The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annu Rev Immunol* 1992;10:411-452.

- Verma V, Chakravarti A, Kar P. Cytokine levels of TGF-beta, IL-10, and sTNFalphaRII in type C chronic liver disease. *Dig Dis Sci* 2008;53:2233-2237.
- Visintin A, Mazzoni A, Spitzer JH, Wyllie DH, Dower SK, Segal DM. Regulation of Toll-like receptors in human monocytes and dendritic cells. *J Immunol* 2001;166:249-255.
- Wack A, Soldaini E, Tseng C, Nuti S, Klimpel G, Abrignani S. Binding of the hepatitis C virus envelope protein E2 to CD81 provides a co-stimulatory signal for human T cells. *Eur J Immunol* 2001;31:166-175.
- Wang CY, Mayo MW, Korneluk RG, Goeddel DV, Baldwin AS Jr. NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science* 1998;281:1680-1683.
- Wasley A, Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C: geographic differences and temporal trends. *Semin Liver Dis* 2000;20:1-16.
- Wiese M, Berr F, Lafrenz M, Porst H, Oesen U. Low frequency of cirrhosis in a hepatitis C (genotype 1b) single-source outbreak in germany: a 20-year multicenter study. *Hepatology* 2000;32:91-96.
- Williams TW, Granger GA. Lymphocyte in vitro cytotoxicity: lymphotoxins of several mammalian species. *Nature* 1968;219:1076-7.
- Witters P, Freson K, Verslype C, Peerlinck K, Hoylaerts M, Nevens F y cols. Blood platelet number and function in chronic liver disease and cirrhosis. *Aliment Pharmacol Ther* 2008; 27: 1017-29.
- Witthöft T, Möller B, Wiedmann KH, Mauss S, Link R, Lohmeyer J y cols. Safety, tolerability and efficacy of peginterferon alpha-2a and ribavirina in chronic hepatitis C in clinical practice: the German Open Safety Trial. *J Viral Hepat* 2007;14:788-796.

- Wong DK, Dudley DD, Dohrenwend PB, Lauer GM, Chung RT, Thomas DL, Walker BD. Detection of diverse hepatitis C virus (HCV)-specific cytotoxic T lymphocytes in peripheral blood of infected persons by screening for responses to all translated proteins of HCV. *J Virol* 2001;75:1229-1235.
- Wu MX, Ao Z, Prasad KV, Wu R, Schlossman SF. IEX-IL, an apoptosis inhibitor involved in NF-kappaB-mediated cell survival. *Science* 1998;281:998-1001.
- Wünschmann S, Medh JD, Klinzmann D, Schmidt WN, Stapleton JT. Characterization of hepatitis C virus (HCV) and HCV E2 interactions with CD81 and the low-density lipoprotein receptor. *J Virol* 2000;74:10055-10062.
- Xiang J, Martinez-Smith C, Gale M Jr, Chang Q, Labrecque DR, Schmidt WN, Stapleton JT. GB virus type C NS5A sequence polymorphisms: association with interferon susceptibility and inhibition of PKR-mediated eIF2alpha phosphorylation. *J Interferon Cytokine Res* 2005;25:261-270.
- Yeung LT, King SM, Roberts EA. Mother-to-infant transmission of hepatitis C virus. *Hepatology* 2001;34:223-229.
- Yoshida H, Kato N, Shiratori Y, Otsuka M, Maeda S, Kato J, Omata M. Hepatitis C virus core protein activates nuclear factor kappaB-dependent signalling through tumor necrosis factor receptor-associated factor. *J Biol Chem* 2001;276:16399-16405.
- Yoshioka K, Kakumu S, Arao M, Tsutsumi Y, Inoue M. Tumor necrosis factor alpha production by peripheral blood mononuclear cells of patients with chronic liver disease. *Hepatology* 1989;10:769-773.
- Yoshioka K, Kakumu S, Arao M, Tsutsumi Y, Inoue M, Wakita T y cols. Immunohistochemical studies of intrahepatic tumor necrosis factor alpha in chronic liver disease. *J Clin Pathol* 1990;43:298-302.

- Yoshioka K, Kakumu S, Wakita T, Ishikawa T, Itoh Y, Takayanagi M y cols. Detection of hepatitis C virus by polymerase chain reaction and response to interferon-alpha therapy: relationship to genotypes of hepatitis C virus. *Hepatology* 1992;16:293-299.
- Zanetti AR, Tanzi E, Newell ML. Mother-to-infant transmission of hepatitis C virus. *J Hepatol* 1999;31:96-100.
- Zeuzem S, Hultcrantz R, Bourliere M, Goesr T, Marcellin P, Sanchez-Tapias J y cols. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin for treatment of chronic hepatitis C in previously untreated patients infected with HCV genotypes 2 or 3. *J Hepatol* 2004;40:993-999.
- Zeuzem S, Schmidt JM, Lee JH, Rüster B, Roth WK. Effect of interferon alfa on the dynamics of hepatitis C virus turnover in vivo. *Hepatology* 1996;23:366-371.
- Zhu N, Khoshnan A, Schneider R, Matsumoto M, Dennert G, Ware C, Lai MM. Hepatitis C virus core protein binds to the cytoplasmic domain of tumor necrosis factor (TNF) receptor 1 and enhances TNF-induced apoptosis. *J Virol* 1998;72:3691-3697.
- Zignego AL, Brechot C. Extrahepatic manifestations of VHC infection: facts and controversies. *J Hepatol* 1999;31:369-376.
- Zylberberg H, Rimaniol AC, Pol S, Masson A, De Groote D, Berthelot P y cols. Soluble tumor necrosis factor receptors in chronic hepatitis C: a correlation with histological fibrosis and activity. *J Hepatol* 1999;30:185-91.